

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗ

BIOCHEMICAL STUDIES ON HUMAN ANGIOGENIN

ΛΑΡΙΣΑ 2018

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΑΓΓΕΙΟΗΕΝΙΝΗ

ΠΑΤΡΑΣΚΑΚΗ ΜΥΡΤΩ

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΠΑΛΑΤΣΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΦΥΣΙΚ

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η διπλωματική αυτή εργασία εκπονήθηκε τη χρονική περίοδο Φεβρουάριος 2018- Ιούνιος 2018, μια δύσκολη χρονική περίοδο την οποία όμως συγκεκριμένα άτομα την έκαναν πιο ευχάριστη. Τα άτομα αυτά θα ήθελα να ευχαριστήσω με λίγα αλλά ειλικρινή λόγια.

Πρώτα από όλα θέλω να ευχαριστήσω τον κύριο Λεωνίδα Δημήτριο για την συνεργασία μας για άλλη μια φορά και στα πλαίσια των μεταπτυχιακών σπουδών μου. Μετράμε πλέον δύομιση χρόνια συνεργασίας (συμπεριλαμβανομένης και της προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας). Μια συνεργασία που χαρακτηρίστηκε από την αρχή μέχρι το τέλος της από καλή επικοινωνία και αμοιβαία εκτίμηση. Η συνεργασία μου με τον κύριο Λεωνίδα είναι αυτή που με έστρεψε στην έρευνα, μου έδειξε τις δυσκολίες αλλά και τις συγκινήσεις που έχει αυτός ο δρόμος και αποτελεί την αφετηρία μου στον χώρο της έρευνας. Για τους λόγους αυτούς αλλά και πολλούς άλλους, πιο ανθρώπινους, τον ευχαριστώ.

Θέλω να ευχαριστήσω τον κύριο Μπαλατσό Νικόλαο καθώς στο σύντομο χρονικό διάστημα που συνεργαστήκαμε, μου μετέδωσε απλόχερα την γνώση του για εργαστηριακές τεχνικές οι οποίες θα μου φανούν εξαιρετικά χρήσιμες στην μετέπειτα πορεία μου. Ευχαριστώ ακόμη την κυρία Κοντού Μαρία, γιατί ακόμη και αν εν τέλη δεν συνεργαστήκαμε στην πράξη, πέρασα πολύ όμορφες στιγμές μαζί της συζητώντας στο γραφείο της για θέματα επιστημονικά και μη. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω και στον κύριο Παπαδόπουλο Γεώργιο, στου οποίου το γραφείο πέρασα τις τελευταίες τρεις εβδομάδες. Η συνεργασία μας τις εβδομάδες αυτές ήταν καταλυτική ώστε να βγουν τελικά τα αποτελέσματα (και οι όμορφες εικόνες) που παρατίθενται παρακάτω. Εκτός από τις όμορφες εικόνες, η συνεργασία μας μου προσέφερε νέες γνώσεις στον τομέα των δομικών μελετών βιομορίων με υπολογιστικές μεθόδους και οι γνώσεις αυτές μου προσέφεραν έναν διαφορετικό τρόπο προσέγγισης ερευνητικών ερωτημάτων.

Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω: την διδάκτορα Χατζηλεοντιάδου Δήμητρα η οποία με εισήγαγε στην θεωρία αλλά και στις πειραματικές τεχνικές που χρησιμοποίησα κατά την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας και που παρά την απόσταση μας, ήταν πάντα πρόθυμη να λύνει τυχόν απορίες την υποψήφια διδάκτορα Παπαϊωάννου Όλγα για την συνεργασία μας και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας.

Τέλος, ευχαριστώ (και γραπτώς) τους πιο κοντινούς μου ανθρώπους που κάνουν την καθημερινότητα μου όμορφη: τον Βύρωνα, την Μάγδα, την Εύη τον Γιάννη, την Αναστασία, τον Συμεών, τον Αχιλλέα και φυσικά την μαμά μου Μαργαρίτα και τον μπαμπά μου Σίμο.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Summary.....	5
1.Εισαγωγή.....	6
1.1 Η υπεροικογένεια της ριβονουκλεάσης Α	6
1.2 Ανθρώπινη αγγειογενίνη.....	7
1.2.1 Δομή της ανθρώπινης αγγειογενίνης.....	8
1.2.1.α Γενικά χαρακτηριστικά.....	8
1.2.1β Δομή και ριβονουκλεολυτική δράση	9
1.2.2 Ρύθμιση της δράσης της ανθρώπινης αγγειογενίνης	10
1.2.3 Μηχανισμοί δράσης της ανθρώπινης αγγειογενίνης	11
1.2.3.α Μεταβολισμός νουκλεϊκών οξέων.....	11
1.2.3.β Ενεργοποίηση μονοπατιών διακυτταρικής επικοινωνίας	13
1.2.3.γ Ενεργοποίηση της αποικοδόμησης της βασικής ενδοθηλιακής μεμ- βράνης	13
1.2.4. Κύριες λειτουργίες της ανθρώπινης αγγειογενίνης.....	15
1.2.4.α Αγγειογένεση	15
1.2.4.β Συμμετοχή στην ανοσοαπόκριση.....	15
1.2.5 Ρόλος της αγγειογενίνης σε ασθένειες	16
1.2.5.α Αγγειογενίνη και ογκογένεση	16
1.2.5.β Αγγειογενίνη και νευροεκφυλιστικές ασθένειες	17
1.2.5.γ Η αγγειογενίνη και άλλες ασθένειες	17
2. Σκοπός	17
3.Υλικά και Μέθοδοι	18
3.1 Συστάσεις διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία:	18
3.2 Δημιουργία μεταλλάγματος με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση.....	19
3.2.1 Μετασχηματισμός και καλλιέργεια κυττάρων κλωνοποίησης <i>E. coli</i> XL1-Blue22	
3.2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης	22

3.3 Υπερέκφραση της ανθρώπινης αγγειογενίνης.....	23
3.3.1 Μετασχηματισμός κυττάρων υπερέκφρασης <i>E. coli</i> BL21-Gold και υπερέκφραση της αγγειογενίνης.....	23
3.4 Απομόνωση και καθαρισμός της μεταλλαγμένης αγγειογενίνης.....	24
3.4.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες και χρώση της πηκτής	26
3.5 Κρυσταλλογραφία	27
3.5.1 Κρύσταλλοι πρωτεϊνών	27
3.5.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων	28
3.6 Πρόβλεψη της δομής του μεταλλάγματος Q117P με μοντελισμό ομολογίας	30
3.6.1 Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής	31
3.6.2 Μεθοδολογία	32
4.Αποτελέσματα	33
4.1 Αποτελέσματα κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης Q117P.....	33
4.2 Αποτελέσματα χρωματογραφικού καθαρισμού της αγγειογενίνης Q117P	34
4.3 Αποτελέσματα ανάπτυξης κρυστάλλων.....	36
4.4 Αποτελέσματα συγκριτικού σχεδιασμού.....	36
4.4.1 Αποτελέσματα πρόσδεσης του δινουκλεοτιδίου CU στο B ₁ κέντρο	37
5.Συζήτηση	40
6.Βιβλιογραφία	43

Περίληψη

Η ανθρώπινη αγγειογενίνη (hAng), γνωστή και ως RNase 5, είναι μια βασική πρωτεΐνη αποτελούμενη από 123 αμινοξέα με μοριακό βάρος 14,4 kDa, που ανήκει στην υπερικογένεια των παγκρεατικών ριβονουκλεασών, αποτελώντας το πέμπτο μέλος αυτής της οικογένειας. Η hAng είναι ένας ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας που συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές διεργασίες όπως η αγγειογένεση, η ανοσοαπόκριση, η φλεγμονή, η νευροπροστασία κ.α. Εμπλέκεται επίσης και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ογκογένεση και ο νευροεκφυλισμός. Παρά την μεγάλη ομολογία της hAng με την RNase A στο καταλυτικό κέντρο, η ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα είναι 10^{-5} - 10^{-6} φορές μικρότερη. Κύρια αιτία η διαμόρφωση της Gln117 αλλά και ολοκλήρου του καρβοξυτελικού άκρου της που εμποδίζει τη σύνδεση του RNA στο κέντρο πρόσδεσης των πυριμιδινών. Αυτό το δομικό χαρακτηριστικό, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς η ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της hAng είναι συνδεδεμένη με την αγγειογενετική της δραστηριότητα. Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη ενός μεταλλάγματος της hAng στο οποίο η γλουταμίνη 117 αντικαθίσταται με προλίνη. Το μετάλλαγμα δημιουργήθηκε με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση και ακολούθησε απομόνωση της μεταλλαγμένης hAng-Q117P από βακτήρια, ανάπτυξη κρυστάλλων, πρόβλεψη της μεταλλαγμένης δομής και πρόσδεσης σε αυτήν ενός δινουκλεοτιδίου με μοντελισμό. Τα αποτελέσματα του μοντελισμού αλλά και της πρόσδεσης του δινουκλεοτιδίου έδειξαν πως υπάρχουν κάποιες μικρές αλλαγές μεταξύ των δύο διαμορφώσεων.

Summary

Human angiogenin (hAng) is a basic protein of 123 amino acids with a molecular weight of 14.4 kDa and the 5th member of the pancreatic ribonuclease A superfamily. hAng is a potent angiogenic factor that plays an important role in many physiological and pathological processes, including angiogenesis, immune responses, inflammation, neuroprotection, tumorigenesis, and neurodegeneration. Despite the homology between the active sites of RNase A and hAng, the ribonucleolytic activity of hAng is 10^{-5} to 10^{-6} fold less than that of RNase A. This difference is attributed to the conformation of the C-terminus and especially to that of Gln117 which prevents binding of RNA at the pyrimidine binding subsite. This structural feature is of great importance as the ribonucleolytic activity of hAng is an absolute prerequisite for its angiogenic activity. In this study site directed mutagenesis was employed to produce a mutant form of hAng where Gln117 was replaced by a proline. The mutant protein (hAng – Q117P) was produced and purified from bacterial culture and used in crystallization experiments. The structure of the hAng – Q117P was generated by homology modelling and the modelled structure was used to dock a dinucleotide. Results showed some differences in the structural mode of binding between hAng – Q117P and the wild type protein.

1.Εισαγωγή

1.1 Η υπεροικογένεια της ριβονουκλεάσης A

Οι ριβονουκλεάσες (RNases) είναι ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεασών και καταλύουν την αποικοδόμηση μορίων RNA καθώς και την παραγωγή μικρότερων μορίων RNA. Οι ριβονουκλεάσες διαίρονται σε ενδοριβονουκλεάσες και εξωριβονουκλεάσες, οι οποίες διακρίνονται περαιτέρω σε δυο υποκατηγορίες, αυτή των φωσφορολυτικών ενζύμων (EC 2.7) και αυτή των υδρολυτικών ενζύμων (EC 3.1). Η βόεια παγκρεατική ριβονουκλεάση A (RNase A), μια ενδοριβονουκλεάση μοριακού βάρους 13,7 kDa αποτελεί το καλύτερα χαρακτηρισμένο μέλος μιας οικογένειας ριβονουκλεασών με διαφορετικά χαρακτηριστικά και βιολογικές δράσεις (*Dyer & Rosenberg, 2006*). Στον άνθρωπο η υπεροικογένεια της ριβονουκλεάσης A αποτελείται από οχτώ εκκρινόμενες πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται όλες από γονίδια που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 14 και έχει καθιερωθεί να αναφέρονται ως κανονικές ριβονουκλεάσες (canonical RNases). Οι πρωτεΐνες αυτές, εκκρίνονται από ποικίλους και διαφορετικούς τύπους ιστών και κυττάρων και σε κάθε μια από αυτές αποδίδονται διάφοροι βιολογικοί ρόλοι, συμπεριλαμβανομένων αντιϊκών, αντιβακτηριακών και αντιμυκητιακών δράσεων καθώς και κυτοτοξικών δράσεων έναντι κυττάρων ξενιστών και παρασίτων. (*Koczera, Martin, Marx, & Schuerholz, 2016*).

Επτά από τα οχτώ μέλη της υπεροικογένειας της RNase A, έχουν τέσσερις δισουλφιδικούς δεσμούς που σχηματίζονται μεταξύ οχτώ κυστεϊνών. Εξάιρεση αποτελεί η RNase 5/αγγειογενίνη, η οποία έχει έξι κυστεΐνες και κατά συνέπεια τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Και στα οχτώ μέλη της υπεροικογένειας εμφανίζεται η συντηρημένη καταλυτική τριάδα, η οποία συγκροτείται από δύο κατάλοιπα ιστιδίνης, (ένα κοντά στο αμινοτελικό άκρο κι ένα κοντά στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης) και ένα κατάλοιπο λυσίνης που βρίσκεται μεταξύ του συντηρημένου μοτίβου CKxxNTF. Ένα άλλο κοινό στοιχείο είναι η ύπαρξη μιας αλληλουχίας-σήμα στο αμινοτελικό άκρο, που κατευθύνει τη βιοσύνθεση της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο καταλήγοντας στην εκκρινόμενη μορφή της πρωτεΐνης. (*Dyer & Rosenberg, 2006*) Οι ριβονουκλεάσες αυτής της οικογένειας έχουν υψηλά ισοηλεκτρικά σημεία (με θεωρητικά υπολογιζόμενες τιμές pI που κυμαίνονται από 8.69 μέχρι 10.12) και είναι θετικά φορτισμένες. (*Boix & Nogues, 2007*). Και οι δύο αυτές ιδιότητες σχετίζονται με την ικανότητα τους να σχηματίζουν ισχυρές αλληλεπιδράσεις με τα υποστρώματά τους, δηλαδή, με αρνητικά φορτισμένα πολυριβονουκλεοτίδια. Η καθεμία από τις κανονικές ριβονουκλεάσες ποικίλει όσον αφορά τη ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα και την προτίμηση σε ριβονουκλεοτίδια ως υποστρώματα, με ταυτόχρονη απουσία αυστηρής εκλεκτικότητας για θέσεις διάσπασης και περιοχές αναγνώρισης. (*Rosenberg, 2008*)

Έχουν αναγνωριστεί διάφορα πρότυπα ρύθμισης της δράσης των κανονικών ριβονουκλεασών π.χ. στο επίπεδο της μεταγραφής ή της έκκρισης τους. Συγκεκριμένα, ο πρωτεϊνικός αναστολέας ριβονουκλεάσης (ribonuclease inhibitor, RI), ο οποίος βρίσκεται σε όλα

τα κύτταρα θηλαστικών, ελέγχει τη δραστηριότητα όλων των RNases με διαφορετικούς τρόπους. Ο RI δεσμεύεται στις ριβονουκλεάσες με συγγένεια της τάξης των femtomolar fM και αναστέλλει ή εξασθενεί τις βιολογικές τους δράσεις, μέσω της δημιουργίας ενός συμπλόκου RNase - RI. (Rutkoski & Raines, 2008).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως ως μέρος του Human Genome Project η φυλογενετική προέλευση της υπερικογένειας της RNάσης A έχει μελετηθεί εκτενώς και έχει αξιολογηθεί περαιτέρω σε σχέση με τις αλληλουχίες γονιδιώματος και άλλων ειδών εκτός του ανθρώπου. Ως αποτέλεσμα, οι RNases RNάσες 2 και 3 μπορούν να ομαδοποιηθούν, όπως επίσης και οι RNases 7 και 8. Μαζί με την RNase 6, αυτές οι 5 RNases φαίνεται να είναι στενά συνδεδεμένες. Αντίστοιχα, ομαδοποιούνται και οι RNases 1, 4 και 5, με μια στενότερη σχέση μεταξύ των RNases 1 και 4. (Dubois, Ursing, Kolkman, & Beintema, 2003) (Rosenberg, 2008). Αν και οι βιοχημικές ιδιότητες της RNase 1 καθώς και η εξέλιξη της υπερικογένειας της RNase A έχουν αξιολογηθεί εκτενώς, η φυσιολογική λειτουργία των μελών αυτής της οικογένειας δεν είναι ακόμα καλά αποσαφηνισμένη.

1.2 Ανθρώπινη αγγειογενίνη

Η ανθρώπινη αγγειογενίνη (human angiogenin/hANG), γνωστή και ως RNase 5, είναι μια βασική πρωτεΐνη αποτελούμενη από 123 αμινοξέα με μοριακό βάρος 14,4 kDa, που όπως προαναφέρθηκε ανήκει στην υπερικογένεια των παγκρεατικών ριβονουκλεασών, αποτελώντας το 5^ο μέλος αυτής της οικογένειας. Όπως και η RNase A, η αγγειογενίνη διασπά φωσφοδιεστερικούς δεσμούς στο 3' άκρο των πυριμιδινών, ακολουθώντας ένα μηχανισμό τρانشφωσφορλίωσης/υδρόλυσης. Πιο συγκεκριμένα, με τρانشφωσφορλίωση σχηματίζονται 2',3' κυκλικά νουκλεοτίδια, τα οποία στη συνέχεια υδρολύονται σχηματίζοντας 3' φωσφορικές ομάδες. Παρόλα αυτά η ριβονουκλεολυτική της δράση είναι 10⁵-10⁶ φορές μικρότερη σε σχέση με αυτήν της RNase A λόγω της διαφορετικής της τρισδιάστατης δομής. (Shapiro, Riordan, Vallee, 1986) (Russo et al., 1996). Αυτή η χαμηλή ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα είναι ουσιώδης και απαραίτητη για την αγγειογενετική της δραστηριότητα, καθώς μεταλλάξεις σε καταλυτικά κατάλοιπα (His13, Lys 40, His114), αλλά και σε κατάλοιπα σημαντικά για την πρόσδεση του υποστρώματος (Thr44), οδηγούν σε μείωση τόσο της ενζυμικής όσο και της βιολογικής της δράσης (αγγειογένεση) (Shapiro & Vallee, 1992)

Η αγγειογενίνη είναι ένας ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας, καθώς μπορεί να προκαλέσει τον σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων σε χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη όρνιθας και σε κερατοειδή χιτώνα κονίκλου, χορηγούμενη σε δόσεις της τάξεως των fM (Fett et al., 1985; King & Vallee, 1991). Αποτελεί το πρώτο βήμα για την επαγόμενη, από άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες, αγγειογένεση, συμπεριλαμβανομένου του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), του βασικού αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF-β), του αυξητικού παράγοντα των όξινων ινοβλαστών (FGF-1) και του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) (Kishimoto, Liu, Tsuji, Olson, & Hu, 2005). Ως εκκρινόμενη πρωτεΐνη, η αγγειογενίνη βρίσκεται σε διάφορους ιστούς και υγρά του ανθρώπου όπως το πλάσμα, το αμνιακό υγρό, το μικροπεριβάλλον των όγκων και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Το διαδεδομένο πρότυπο έκφρασής της υποδεικνύει ότι οι φυσιολογικές αλλά και οι παθολογικές της λειτουργίες δεν περιορίζονται στην αγγειογένεση. Πράγματι, η αγγειογενίνη εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και μη διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της ογκογένεσης, της έμφυ-

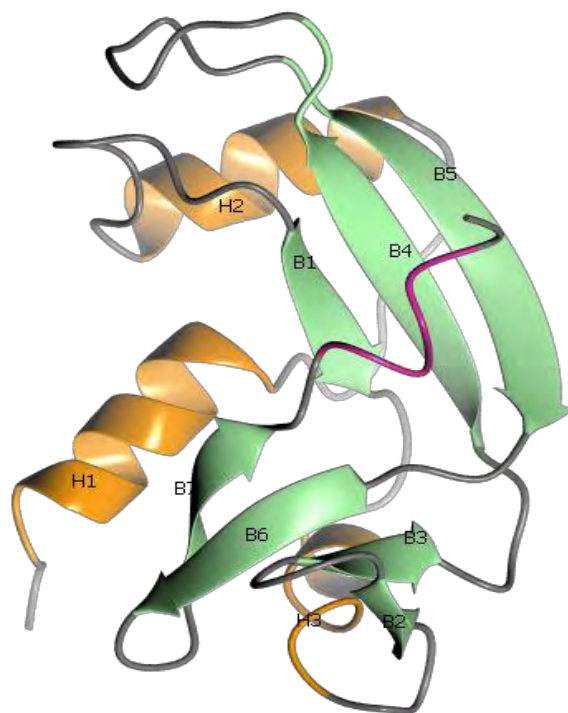
της ανοσίας, της νευροπροστασίας, της φλεγμονής και της αναγέννησης των ιστών που έχουν υποστεί βλάβη. (Sheng & Xu, 2016). Επίσης, μεταλλάξεις, απώλειες λειτουργίας του ανθρώπινου γονιδίου της αγγειογενίνης, έχουν ταυτοποιηθεί σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) και η ασθένεια του Parkinson. (Bradshaw et al., 2017)

Η εκκρινόμενη αγγειογενίνη προσδένεται στο εξωτερικό των κυττάρων σε μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 170 kDa, που δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμη πλήρως, ενεργοποιώντας με αυτόν τον τρόπο διάφορα διακυτταρικά μονοπάτια. Ακόμη, η εξωκυττάρια αγγειογενίνη αλληλεπιδρά με την ακτίνη στην επιφάνεια των κυττάρων οδηγώντας στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας επιτρέποντας έτσι, την κυτταρική μετανάστευση και διήθηση (Sheng & Xu, 2016). Έχει επίσης αποδειχθεί, ότι η αγγειογενίνη ως απόκριση σε αναπτυξιακά ερεθίσματα, υφίσταται πυρηνική μετατόπιση, όπου διεγείρει τη μεταγραφή του mRNA καθώς και τη μεταγραφή-επεξεργασία του ριβοσωμικού RNA (με προτίμηση στο 18S και στο 28S rRNA) (Shapiro, Riordan, & Vallee, 1986), δυο δράσεις που είναι απαραίτητες για την κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. (Kishimoto et al., 2004) Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η αγγειογενίνη, ως απόκριση στο στρες, εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και συσσωρεύεται στα κοκκία του στρες (SGs) διασπώντας το tRNA σε θραύσματα (tiRNAs), τα οποία μπορούν να αναστείλουν την έναρξη της μετάφρασης. Αυτό Αυτή δράση αποτελεί ένα ρόλο-κλειδί στην απόκριση στο στρες και στην κυτταρική επιβίωση, καθώς οδηγεί στον επαναπρογραμματισμό της πρωτεϊνικής έκφρασης και συνεπώς στην επιβίωση του κυττάρου, καθιστώντας έτσι την αγγειογενίνη μια αποκρινόμενη στο στρες RNase. (Yamasaki et al., 2009)

1.2.1 Δομή της ανθρώπινης αγγειογενίνης

1.2.1.α Γενικά χαρακτηριστικά

Η τριτοταγής δομή της hAng αποτελείται από δυο λοβούς. Ο λοβός I απαρτίζεται από τέσσερα αντιπαράλληλα β-ελάσματα β, τα B2, B3, B6 και B7 (κατάλοιπα 62-65, 69-72, 104-108 και 115-117 αντίστοιχα). (Leonidas et al., 1999) Εκατέρωθεν αυτής της επικράτειας, βρίσκονται δύο έλικες, η H1 και η H3 (κατάλοιπα 3-13 και 50-57, αντίστοιχα). Ο λοβός II συγκροτείται από μια β-πτυχωτή επιφάνεια που σχηματίζεται από τρία αντιπαράλληλα β-ελάσματα, τα B1, B4 και B5 (κατάλοιπα 42-46, 76-84 και 93-101 αντίστοιχα). Αυτή η β-πτυχωτή επιφάνεια βρίσκεται ενδιάμεσα από μια έλικα H2 (κατάλοιπα 23-32) και από μια έλικα 3_{10} (κατάλοιπα 117-121). Η αγγειογενίνη έχει τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο ένας βρίσκεται στο λοβό 1 και ενώνει το β-έλασμα B6 με την έλικα H3, ενώ οι άλλοι δύο βρίσκονται στον λοβό II, όπου ο ένας ενώνει το B4 με την H2 και ο άλλος ενώνει δύο επιμήκους βρόχους (H2/B1 και B4/B5). (Leonidas et al., 1999)



Εικόνα 1 Τρισδιάστατη δομή της hAng. Φαίνονται τα οι έλικες H1-H3 και τα ελάσματα B1-B7. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα CCP4 Molecular graphics.

1.2.1β Δομή και ριβονουκλεολυτική δράση

Η αγγειογενίνη παρουσιάζει 33% ταύτιση αμινοξικής αλληλουχίας και 65% συνολική ομολογία με την RNase A (Riordan & Vallee, 1988). Το ενεργό κέντρο της είναι συντηρημένο και αποτελείται από διάφορα υποκέντρα σύνδεσης, φωσφορικών ιόντων, αζωτούχων βάσεων και ριβοζών (που ονομάζονται P_0-P_n , B_0-B_n , R_0-R_n αντίστοιχα). Από αυτά, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν: το P_1 όπου βρίσκονται τα τρία καταλυτικά κατάλοιπα (His-13, Lys-40, His-114) και στο οποίο επιτελείται η διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού, το B_1 , όπου υπάρχουν τα συντηρημένα κατάλοιπα Thr44, Leu115 και Ser118 και στο οποίο δεσμεύονται οι 3' πυριμιδίνες. Το υποκέντρο B_2 δεν παρουσιάζει υψηλό βαθμό συντήρησης και αλληλεπιδρά με τις 5' πουρίνες. (Leonidas *et al.*, 1999)

Παρά το γεγονός ότι η hAng έχει απόλυτη συντήρηση με την RNase A στο καταλυτικό κέντρο, η ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα είναι σημαντικά μικρότερη. Μελέτες μεταλλαγμένης σε συνδυασμό με κρυσταλλογραφικές μελέτες απεκάλυψαν τα μοναδικά χαρακτηριστικά στη δομή της που συμβάλλουν στην εξασθένηση της ενζυμικής της ισχύος. Κυρίαρχη θέση ανάμεσά τους κατέχει η παρεμποδιστική διαμόρφωση της Gln117 στο υποκέντρο πρόσδεσης των πυριμιδινών (B_1). Αυτό το δομικό χαρακτηριστικό της αγγειογενίνης, έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία πρόσδεσης και συνεπώς τη διάσπαση του RNA. (Leonidas, Shapiro, Subbarao, Russo, & Acharya, 2002)

Η ανενεργή διαμόρφωση της hAng και η «κλειστή» διαμόρφωση του καρβοξυτελικού άκρου (στο τμήμα αυτό βρίσκεται και η Gln117) υποστηρίζεται με αλληλεπιδράσεις με τα υπόλοιπα κατάλοιπα της πρωτεΐνης. Πιο αναλυτικά, η πλευρική αλυσίδα της Gln117 σχηματίζει δυο δεσμούς υδρογόνου με την Thr44, ενώ επίσης με δυο δεσμούς υδρογόνου συνδέονται μεταξύ τους η Asp116 και η Ser118 (που πλαισιώνουν την Gln117). Ο προσανατολισμός της

Gln117 φαίνεται να ενισχύεται περισσότερο από τη δευτεροταγή δομή του τμήματος των αμινοξέων 117-121, μια έλικα 3_{10} στην οποία οι δεσμοί υδρογόνου της κύριας αλυσίδας συνδέουν την Gln117 με την Phe120 και την Ser118 με την Arg121. Επιπλέον, φαίνεται πως οι ενδομοριακές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της Ile119 και της Phe120 συμβάλουν περαιτέρω στη διατήρηση της παρεμποδιστικής θέσης αυτής της έλικας. Ακόμη, τα κατάλοιπα 121-123 παρότι δεν έχουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της παρεμποδιστικής δομής, όταν αποκοπούν από τη δομή, οδηγούν στη δημιουργία μιας πρωτεΐνης με δραστικότητα έναντι του RNA μειωμένη κατά 10 τάξεις μεγέθους. Από το γεγονός αυτό συμπεραίνεται πως τα συγκεκριμένα κατάλοιπα παίζουν θετικό ρόλο στη διάσπαση του RNA, συμμετέχοντας στην πρόσδεσή του σε κέντρα πέρα από τον κεντρικό πυρήνα του ενεργού κέντρου. Συνεπώς, προκειμένου να μπορέσει το RNA να προσδεθεί στην αγγειογενίνη, θα πρέπει αυτή να υποστεί δομικές αλλαγές, τέτοιες ώστε: να αποσταθεροποιηθούν οι δεσμοί που συγκροτούν την έλικα 3_{10} και ακολούθως να μετακινηθεί η πλευρική αλυσίδα της Gln117 από το υποκέντρο B_1 , ώστε να απελευθερωθεί η θέση πρόσδεσης της 3' πυριμιδίνης και τέλος να διαταραχθούν και οι αλληλεπιδράσεις των Ile119-Phe120 που είναι επικουρικές της παρεμποδιστικής δομής (Leonidas et al., 2002).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως η παρεμπόδιση του B_1 δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που η ριβονουκλεολυτική δραστικότητα της hAng είναι μειωμένη, καθώς και η δομή του B_2 όπου προσδέονται τα μόρια των πουρινών διαφέρει από το αντίστοιχο της RNase A. Το υποκέντρο αυτό, επικαλύπτεται με τη θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας. Αυτό είναι ενδεχομένως μια παράπλευρη συνέπεια της εξέλιξης αυτής της θέσης, για πρόσδεση ενός διαφορετικού προσδέτη, καθώς η αντίστοιχη θέση στην RNase A προσδένει και εκεί ένα μόριο πουρίνης, (Russo et al., 2016). Αυτό το πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων στην καρβοξυτελική περιοχή της αγγειογενίνης εξελίχθηκε προφανώς με στόχο να καταστήσει λανθάνουσα την ριβονουκλεολυτική δραστικότητα της αγγειογενίνης και όχι να την καταργήσει τελείως. Ο διπλός αυτός ρόλος λοιπόν της καρβοξυτελικής αλυσίδας που έχει και αρνητική (Asp116-Phe120) αλλά και θετική (Arg121-Pro123) συμβολή στη δραστικότητα, υποδηλώνει ότι η καρβοξυτελική περιοχή έχει βασικό ρόλο στην ρύθμιση της λειτουργίας της αγγειογενίνης. (Russo, Nobile, et al., 1996)

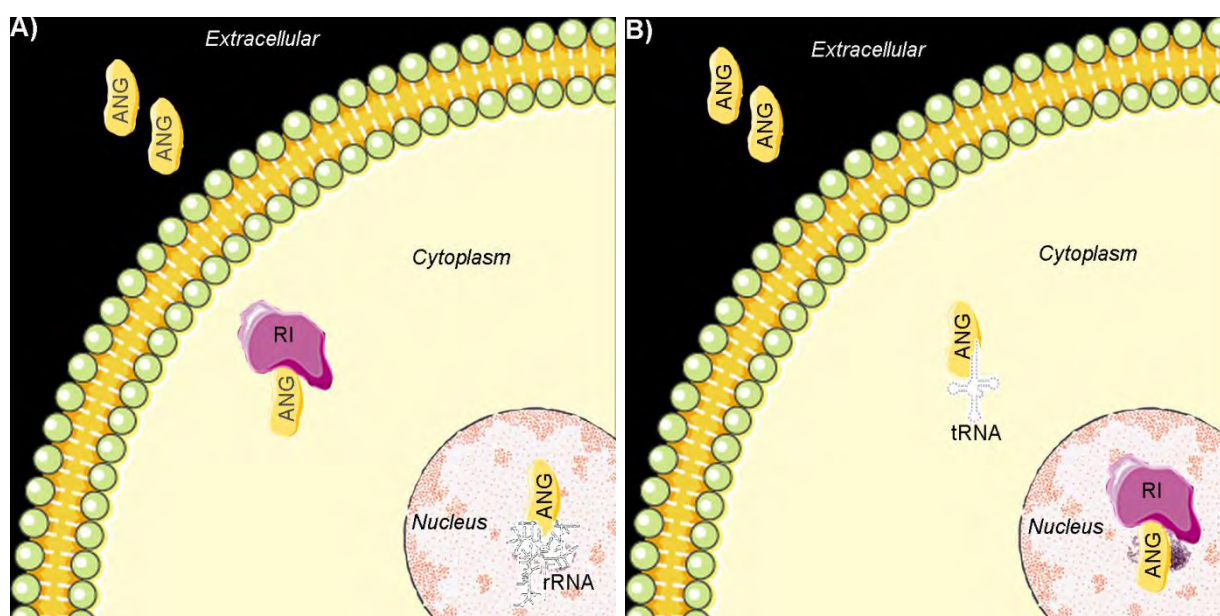
1.2.2 Ρύθμιση της δράσης της ανθρώπινης αγγειογενίνης

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο τρόπος με τον οποίο ρυθμίζονται η αγγειογενετική και η ριβονουκλεολυτική δραστικότητα της hAng, ώστε να ανταποκρίνονται στις ανάγκες του οργανισμού κάθε δεδομένη χρονική στιγμή. Όσον αφορά τη ρύθμιση της αγγειογενετικής της δράσης, λίγα είναι γνωστά, έχει όμως αποδειχθεί πως σε μεταγραφικό επίπεδο, η υπερэкφραση του miR-409-3p καταστέλλει την μεταγραφή του γονιδίου, ενώ αντίστοιχα η υπερπαραγωγή IL-6 οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφής αλλά και της έκφρασης της αγγειογενίνης. (Veserlis, Olson & Fett, 1999) (Weng et al., 2012)

Όσον αφορά την ρύθμιση της ριβονουκλεολυτικής δραστικότητας, το γεγονός ότι η αγγειογενίνη μετακινείται σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα εκτελώντας διαφορετικές δράσεις και το ότι αυτή η μετακίνηση εξαρτάται από αναπτυξιακούς ή στρεσογόνους παράγοντες (μεταγραφή rRNA στον πυρηνίσκο-παραγωγή tiRNAs στο κυτταρόπλασμα υπό συνθήκες stress), αποτελεί από μόνο του έναν τρόπο ρύθμισης. Πέρα από την διαμερισμα-

τοποίηση όμως, η hAng υφίσταται περεταίρω ρύθμιση της δράσης της εντός των διάφορων υποκυτταρικών διαμερισμάτων, έτσι ώστε να μην υπάρχει ανεξέλεγκτη διάσπαση RNA. Η ρύθμιση αυτή επιτελείται από μια πρωτεΐνη μοριακού μεγέθους 50 kDa, τον ανθρώπινο αναστολέα των ριβονουκλεασών (hRI). Ο hRI προσδένεται ισχυρά στην αγγειογενίνη με σταθερά διάσπασης $K_d < 1$ fM. (Lee, Shapiro, & Vallee, 1989) Κάτω από αναπτυξιακές συνθήκες, ο hRI αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική hAng αλλά όχι με την πυρηνική, έτσι ώστε η δεύτερη να είναι ενεργή και να προάγει την κυτταρική ανάπτυξη ενώ η κυτταροπλασματική να είναι ανεσταλμένη. Αντίθετα, υπό συνθήκες stress, ο hRI αλληλεπιδρά με την πυρηνική hAng και όχι την κυτταροπλασματική, έτσι ώστε αυτή να είναι ελεύθερη να δράσει συμβάλλοντας στην κυτταρική απόκριση στο στρες. (Pizzo et al., 2013)

Τέλος, πρόσφατα δείχθηκε πως η φωσφορυλίωση μιας εκ τριών συγκεκριμένων σε-ρινών (S37, S28 και S87) και μια θρεονίνης (T36), δίνει στην hAng τη δυνατότητα να αποφεύγει τον hRI και να εισέρχεται στον πυρήνα. Η φωσφορυλίωση αυτή γίνεται από την πρωτεϊνική κινάση A και την κυκλινοεξαρτώμενη κινάση και ενδεχομένως να αποτελεί ένα μηχανισμό που χρησιμοποιείται από τα ενδοθηλιακά και τα καρκινικά κύτταρα ώστε να ενισχυθεί ο πολλαπλασιασμός τους. (Hoang & Raines, 2017)



Εικόνα 2 Ρύθμιση της αγγειογενίνης μέσω διαμερισματοποίησης. Α) Σε αναπτυξιακές συνθήκες η αγγειογενίνη εισέρχεται στον πυρήνα και συμμετέχει στην μεταγραφή/τροποποίηση του rRNA, ενώ η κυτταροπλασματική αγγειογενίνη δεσμεύεται από τον αναστολέα και αδρανοποιείται. Β) Σε στρεσογόνες συνθήκες η πυρηνική αγγειογενίνη αναστέλλεται από τον hRI ενώ η κυτταροπλασματική είναι ελεύθερη να συσσωρευτεί στα κοκκία του στρες και να αποικοδομήσει το tRNA προς παραγωγή tiRNAs. RI= ribonuclease inhibitor, ang=angiogenin. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα Cell Illustrator.

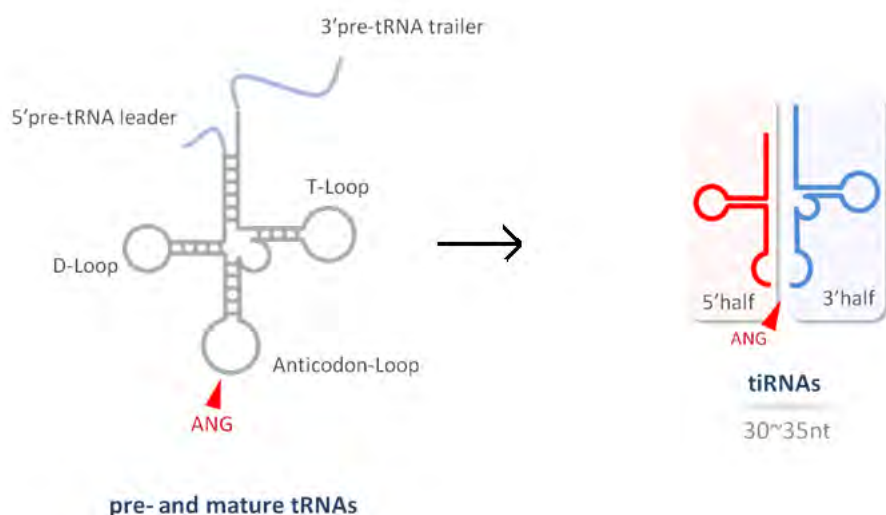
1.2.3 Μηχανισμοί δράσης της ανθρώπινης αγγειογενίνης

1.2.3.α Μεταβολισμός νουκλεϊκών οξέων

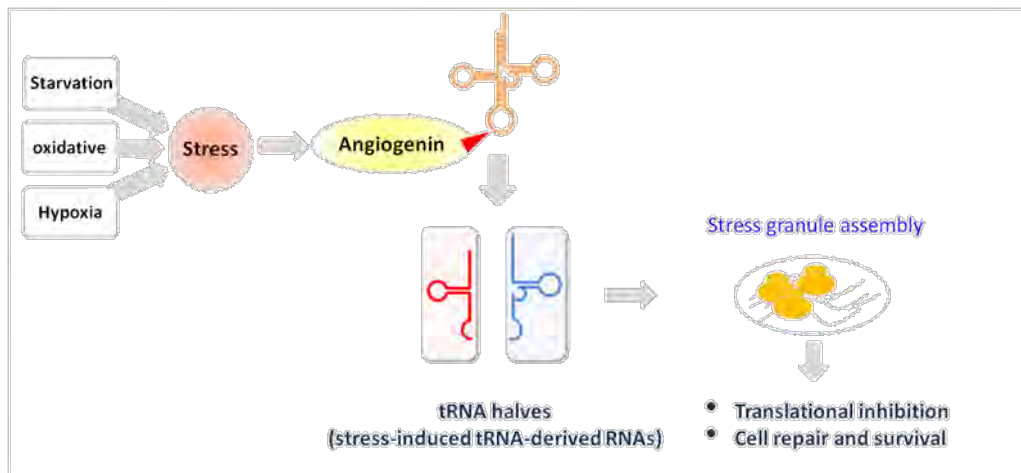
Μια σειρά μελετών έχουν επισημάνει πως η μετατόπιση της αγγειογενίνης στον πυρήνα έχει ως αποτέλεσμα τη συμμετοχή της στο μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων. Είναι πλέον σαφές ότι η αγγειογενίνη επάγει την μεταγραφή του 47s pre-rRNA (το οποίο

στη συνέχεια παράγει το 18S rRNA, το 28S rRNA και το 5.8S rRNA) καθώς προσδένεται στην ABE περιοχή (Angiogenin Binding Element) και στην UCE περιοχή (Upstream Core Element) του εκκινητή του rDNA και πυροδοτεί την συναρμολόγηση του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής μέσω μεθυλίωσης και τροποποίησης των ιστονών. (Sheng & Xu, 2013) (Xu et al., 2003) Πέρα από τη συμμετοχή της αγγειογενίνης στη μεταγραφή και την επεξεργασία του rRNA υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι το πλεόνασμα της αγγειογενίνης στον πυρήνα σχετίζεται και με την μεταγραφή του mRNA. Μελέτες ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης κατέδειξαν 699 γονίδια που ενδέχεται να ρυθμίζονται από την αγγειογενίνη. Με βάση παρατηρήσεις που θέλουν την αγγειογενίνη να δύναται να μεταβάλλει τη διαμόρφωση των ιστονών μέσω απευθείας σύνδεσης μαζί τους, είναι πιθανό να δρα και ως ενεργοποιητής αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Καθώς δεν υπάρχει καμία ένδειξη ότι έχει δράση μεθυλοτρανσφεράσης ή ακετυλοτρανσφεράσης είναι πιθανό να δρα ως δομικό στοιχείο ή ως πρωτεΐνη προσαρμογέας για να στρατολογηθούν άλλες πρωτεΐνες που μεταβάλλουν τη διαμόρφωση της χρωματίνης. (Sheng & Xu, 2016)

Η επαγόμενη από την αγγειογενίνη παραγωγή tiRNAs, αναπρογραμματίζει το μοτίβο έκφρασης των πρωτεϊνών συμβάλλοντας στην κυτταρική επιβίωση. Από τα 2 “μισά” τμήματα tRNA που παράγονται από την αγγειογενίνη, μόνο τα 5’ tiRNA και όχι τα 3’ tiRNA μπορούν να αναστείλουν την μετάφραση. Οι ξέχωρες αυτές λειτουργίες των τμημάτων μπορεί να είναι συνέπεια του διαφορετικού μεγέθους και της διαφορετικής σταθερότητας. Αξίζει ακόμη να σημειωθεί ότι ο ακριβής μοριακός ρόλος των τμημάτων αυτών καθώς και η εντόπιση, η σχετική αφθονία και η σταθερότητα τους δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως. (Ivanov, Emara, Villen, Gygi, & Anderson, 2011)



Εικόνα 3α. Βιογένεση των tiRNAs. Σε διάφορες στρεσογόνες συνθήκες, η αγγειογενίνη τέμνει το tRNA στην αντι-κωδική αλυσίδα, και παράγονται δυο τμήματα tiRNAs (tiRNAs halves), το 5'-tRNA και το 3'- tRNA



Εικόνα 38. Τα tiRNAs που παράγονται από την αγγειογενίνη προάγουν τον σχηματισμό των κοκκίων του στρες και συσσωρεύονται μέσα σε αυτά. Τα 5 tiRNAs αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση καθώς εκτοπίζουν τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4G από το mRNA. Η αλλαγή στο πρωτεϊνικό μοτίβο έκφρασης έχει στόχο την κυτταρική επιβίωση (Sobala & Hutvagner, 2013) (Emara et al., 2010)

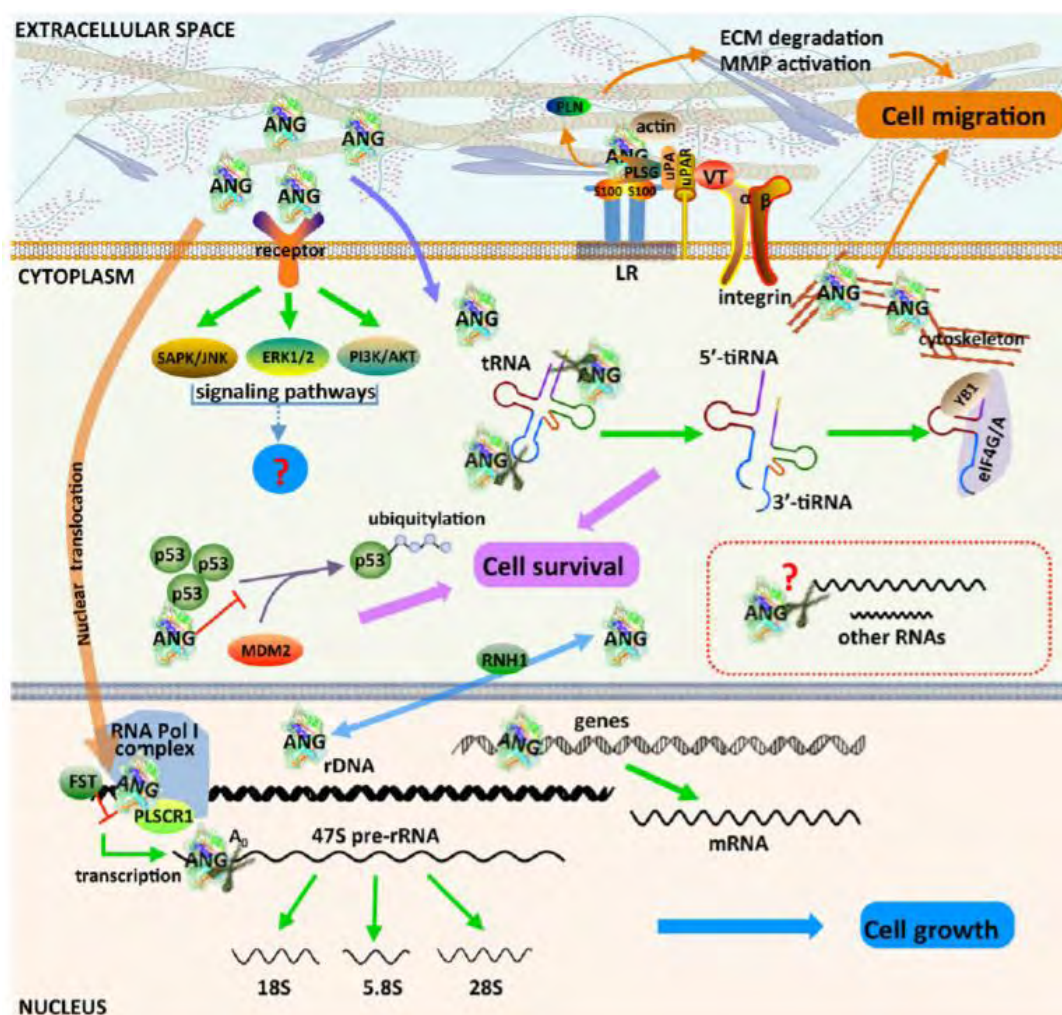
1.2.3.β Ενεργοποίηση μονοπατιών διακυτταρικής επικοινωνίας

Στο εξωκυττάριο περιβάλλον, η hAng μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από διακυτταρικές απεκκρίσεις μέσω της πρόσδεσής της στον υποδοχέα κυτταρικής επιφάνειας. Μπορεί να ενεργοποιήσει μόρια-τελεστές που έχουν ρόλο-κλειδί στην παραγωγή ριβοσωμικών πρωτεϊνών και ενισχύουν την κυτταρική ανάπτυξη. Τέτοια μόρια είναι: η σηματοεξαρτώμενη κινάση ERK(1/2), η πρωτεϊνική κινάση B/Akt, η σχετιζόμενη με το στρες πρωτεϊνική κινάση και η c-Jun κινάση (SAPK/JNK) (Sheng & Xu, 2016). Επίσης, η hAng μπορεί μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού της PI3K/Akt κινάσης να επάγει την παραγωγή νιτρικού οξέος που είναι σημαντικός ρυθμιστής της αγγειακής φυσιολογίας (Trouillion et al., 2010). Τέλος, η hAng φαίνεται να έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι κυτταρικής επιβίωσης που μεσολαβείται από τον NF-κB καθώς και να αλληλεπιδρά με την p53, να εμποδίζει τη δράση της κι έτσι να ενισχύεται το αντιαποπτωτικό μονοπάτι της (Sadagopan et al., 2012).

1.2.3.γ Ενεργοποίηση της αποικοδόμησης της βασικής ενδοθηλιακής μεμβράνης

Στο κυτταρικό περιβάλλον των όγκων η hAng φτάνει στην κυτταρική επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων όπου συνδέεται στην ακτίνη και υφίσταται πλέον ως σύμπλοκο (AngBP). Το σύμπλοκο αυτό διεγείρει τη μεσολαβούμενη από τον ενεργοποιητή πλασμινογόνου (μια πρωτεάση σερίνης), παραγωγή πλασμίνης από το πλασμινογόνο. Η πλασμίνη είναι ένα ένζυμο του πλάσματος που συμμετέχει στη διάσπαση των θρόμβων αλλά και στη διάσπαση της λαμινίνης, της φιμπρονεκτίνης και της βασικής ενδοθηλιακής μεμβράνης, προάγοντας έτσι τη μετανάστευση των κυττάρων. Η αλληλεπίδραση αγγειογενίνης-ακτίνης προκαλεί αλλαγές στον κυτταροσκελετό, όπως η αναστολή του πολυμερισμού της G-ακτίνης (ελεύθερο μονομερές) καθώς και αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες της F-ακτίνης (γραμμικό πολυμερές). Οι δράσεις αυτές επάγουν την αποικοδόμηση της βασικής ενδοθηλιακής μεμβράνης και της εξωκυττάριας μήτρας, επιτρέποντας έτσι στα ενδοθηλιακά κύτ-

ταρα να διηθούνται και να μεταναστεύουν στον περιαγγειακό ιστό, ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της αγγειογένεσης. (Sheng & Xu, 2016)



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών δράσης της hANG. Η εκκρινόμενη αγγειογενίνη προσδένεται στον υποδοχέα επιφάνειας στην εξωκυτταρική μεμβράνη των κυττάρων και με ενδοκύτωση εισέρχεται στο εσωτερικό όπου συσσωρεύεται α) στον πυρήνισκο υπό αναπτυξιακές συνθήκες και β) στο κυτταρόπλασμα υπό συνθήκες στρες. Πρώτον, η εξωκυττάρια hANG ενεργοποιεί μονοπάτια μεταγωγής σήματος που περιλαμβάνουν τις σηματοδοτικές οδούς των SAPK/JNK, ERK1/2 και των PI3K/AKT σε διαφορετικά κύτταρα αλλά και σε διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες. Η αλληλεπίδραση της αγγειογενίνης και του συμπλόκου κυτταρικής επιφάνειας (AngBP) μπορεί να οδηγήσει στην αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μεμβράνης και την ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών και κατ' επέκταση στην κυτταρική μετανάστευση και εισβολή. Δεύτερον, η κυτταροπλασματική αγγειογενίνη ως απάντηση στο στρες, διασπά το tRNA προς σχηματισμό tiRNAs. Τα 5'tiRNAs αλληλεπιδρούν με τον μεταφραστικό αναστολέα YB-1, ο οποίος στρατολογεί τον eIF4G/A από τα mRNAs που δεν έχουν καλύπτα. Η αγγειογενίνη επίσης αναστέλλει την φωσφορυλίωση στη Ser15 της p53 και την επακόλουθη πρόσδεση της Mdm2 που έχει ως αποτέλεσμα την ουβικιτίνωση της p53. Τρίτον, υπό αναπτυξιακές συνθήκες η πυρηνική αγγειογενίνη συμμετέχει στην επεξεργασία/μεταγραφή του rRNA και τη μεταγραφή του mRNA. (Sheng & Xu, 2016)

1.2.4. Κύριες λειτουργίες της ανθρώπινης αγγειογενίνης

1.2.4.α Αγγειογένεση

Η αγγειογένεση είναι μια περίπλοκη βιολογική διαδικασία που αποτελείται από πολλά διαφορετικά, αλλά με ακρίβεια ρυθμισμένα από πολλά μόρια, βήματα. Τα βήματα αυτά συνοψίζονται ως εξής:

1. Αγγειοδιαστολή των προϋπαρχόντων αγγείων και σχηματισμός αγγειωδών οργανιδίων (*vesiculo-vacuolarorganelle*) στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο πιο σημαντικός τελεστής αυτού του σταδίου είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αναπτυξιακός παράγοντας (VEGF).
2. Αποσταθεροποίηση των αγγείων και των ενδοθηλιακών μεμβρανών, ώστε να γίνει η αναμόρφωση του περιαγγειακού στρώματος. Σε αυτό το βήμα εμπλέκονται η αγγειοποιητίνη 2 καθώς και πρωτεάσες (πχ. Μεταλλοπρωτεϊνάσες μεμβρανών).
3. Πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων και μετανάστευση τους ταυτόχρονα με διαβαθμίσεις χημειοτακτικών παραγόντων κατά μήκος της αποσαρτωμένης ενδοθηλιακής μεμβράνης προς τον αναδιαμορφωμένο περιαγγειακό χώρο. Τελεστές αυτού του βήματος είναι η hAng, ο VEGF, οι αγγειοποιητίνες, καθώς και μόρια όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, οι χημειοκίνες κ.α.
4. Σχηματισμός αυλών και σταθεροποίηση των αγγείων από τα μεταναστεύοντα ενδοθηλιακά κύτταρα που πρώτα σχηματίζουν μονόστοιβα και στη συνέχεια σωληνοειδής δομές, οι οποίες περιβάλλονται από μεσεγχυματικά κύτταρα και αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα. Σε αυτό το βήμα συμμετέχουν διάφορες μορφές του VEGF και ιντεγκρίνες.

Το σύνολο των μηχανισμών δράσεων της αγγειογενίνης υποδεικνύει τον ρόλο της στην αγγειογένεση, καθώς συμμετέχει στη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω επαγωγής άλλων μορίων-τελεστών. Μια υπόθεση για την πλήρη σειρά των γεγονότων είναι η εξής : (i) ιστική βλάβη που οδηγεί στην απελευθέρωση ακτίνης και RNA προερχόμενο από τα νεκρωτικά και τα αποπτωτικά κύτταρα και επαγωγή της έκφρασης αγγειογενίνης, (ii) πρόσδεση της αγγειογενίνης στην ακτίνη της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενεργοποίηση των πρωτεασών και διάλυση της βασικής μεμβράνης, (iii) έκφραση του υποδοχέα κυτταρικής επιφάνειας, στον οποίο προσδένεται η αγγειογενίνη, ενδοκύτωση της και μετακίνηση της στον πυρήνα, (iv) εισχώρηση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσα από τη βασική μεμβράνη και τέλος (v) ωρίμανση των τοιχωμάτων των αγγείων μέσω μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων. (Tello-Montoliu, Patel, Lip, 2006)

1.2.4.β Συμμετοχή στην ανοσοαπόκριση

Ως μέρος της έμφυτης ανοσίας, η αγγειογενίνη βρίσκεται στα δάκρυα και προστατεύει την οφθαλμική επιφάνεια δρώντας ως αντιμικροβιακό πεπτίδιο. Η αγγειογενίνη παράγεται επίσης σε αφθονία στα κύτταρα του ενδοθηλίου του εντέρου δρώντας και εκεί ως αντιμικροβιακός παράγοντας. Εκτός από τις αντιβακτηριδιακές της δράσεις η αγγειογενίνη ενεργεί και ως αντιικός παράγοντας καθώς είναι μια από τις δύο RNases που παράγονται

από τα Τ-λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, η αγγειογενίνη ενδέχεται να έχει αντιφλεγμονώδη δράση καθώς έχει παρατηρηθεί πως η συγκέντρωσή της στον ορό αυξάνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της αντιφλεγμονώδους απόκρισης καθώς και κατά τη χορήγηση ιντερλευκίνης-1β. Ο μηχανισμός με τον οποίο η αγγειογενίνη καταστέλλει την φλεγμονώδη αντίδραση μπορεί να περιλαμβάνει και την αναστολή της μεσολαβούμενης από τον TBK-1 (πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης), πυρηνική μετατόπιση του NF-κΒ. (Sheng & Xu, 2016)

1.2.5 Ρόλος της αγγειογενίνης σε ασθένειες

1.2.5.α Αγγειογενίνη και ογκογένεση

Η ογκογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία πολλών σταδίων που περιλαμβάνει όχι μόνο γενετικές και επιγενετικές αλλαγές στα καρκινικά κύτταρα αλλά και την ύπαρξη συνθηκών στο μικροπεριβάλλον των όγκων που ευνοεί την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Η αγγειογενίνη επηρεάζει σχεδόν όλα από αυτά τα στάδια συμπεριλαμβανομένης και της προστασίας των καρκινικών κυττάρων από αντίξοες για την επιβίωσή τους συνθήκες, την προαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την ενίσχυση της μετάστασης και της διήθησης των καρκινικών κυττάρων και φυσικά την επαγωγή αγγειογένεσης.

Η αγγειογενίνη, ως μια αποκρινόμενη στο στρες RNase, παρουσιάζει αύξηση της έκφρασής της στα καρκινικά κύτταρα σε συνθήκες υποξίας. Απαραίτητος παράγοντας για την έκφραση της αγγειογενίνης σε συνθήκες υποξίας είναι ο επαγόμενος από υποξία παράγοντας 1 (Hypoxia-inducible factor 1). Στο μικροπεριβάλλον των όγκων, η hAng εκκρίνεται από τα καρκινικά κύτταρα και επάγει την ανάπτυξη του όγκου, καθώς επάγει άμεσα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος η hAng προκαλεί το σχηματισμό σωληνοειδών δομών ενδοθηλιακών κυττάρων. Στον καρκίνο του προστάτη, η εξωκυττάρια hAng επάγει την διήθηση στο εσωτερικό του όγκου των φυσιολογικών ινοβλαστών, η εισβολή αυτή όμως επαρκεί για να εισέλθουν και οι σχετιζόμενοι με τον καρκίνο ινοβλάστες. Επομένως, η hAng μπορεί να προκαλεί την αποικοδόμηση της βασικής και της εξωκυτταρικής μεμβράνης και να επιτρέπει την μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων στο εσωτερικό τον όγκων. Επιπλέον, τα μικροαγγεία που σχηματίζονται από τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα σε συνθήκες υποξίας ή στέρησης ορού, περιέχουν hAng, η οποία συμμετέχει κυρίως στις διαδικασίες επαγωγής της αγγειογένεσης που τελούνται από τα μικροαγγεία. Η hAng επάγει επίσης και τον αγγειογενετικό μιμητισμό των κυττάρων του ινωσαρκώματος, μια διαδικασία κατά την οποία σχηματίζονται μικροαγγεία από επιθετικά, μεταστατικά και γενετικά απορυθμισμένα καρκινικά κύτταρα. Ο αγγειογενετικός μιμητισμός διαφέρει από την αγγειογένεση, καθώς εμφανίζεται *de novo*, χωρίς την παρουσία ενδοθηλιακών κυττάρων, όπου τα καρκινικά κύτταρα ουσιαστικά μιμούνται αποτελεσματικά ένα πραγματικό αγγειακό ενδοθήλιο. Όλες αυτές οι διεργασίες στις οποίες συμμετέχει η hAng μαρτυρούν πως βοηθά την αγγειογένεση των όγκων και/ή τον αγγειογενετικό μιμητισμό, επιτρέποντας έτσι τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων δια μέσου της αιματικής κυκλοφορίας. Τέλος, ένας άλλος ρόλος της hAng στην ογκογένεση μπορεί να έγκειται στην καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς η hAng έχει και κάποιες ανοσοκατασταλτικές δράσεις. (Sheng & Xu, 2016)

1.2.5.β Αγγειογενίνη και νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

Η πρώτη μελέτη που πρότεινε πως υπάρχει κάποια σύνδεση μεταξύ της hAng και της αμυοτροφικής πλάγιας σκλήρυνσης (ALS), μιας προοδευτικής νευροεκφυλιστικής διαταραχής που επηρεάζει το άνω και το κάτω μέρος των κινητήριων νευρώνων, δημοσιεύτηκε το 2004 και από τότε έχουν αναγνωριστεί 29 μοναδικές μη συνώνυμες παραλλαγές του γονιδίου της hAng σε 6.471 ασθενείς με ALS και σε 3.146 ασθενείς με Πάρκινσον (Sheng & Xu, 2016). Αρκετές από αυτές τις μεταλλάξεις φαίνεται να αλλοιώνουν τη ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα, την ικανότητα πυρηνικής μετατόπισης και την αγγειογενετική δράση της hAng. Στην πραγματικότητα, στο γονίδιο της hAng βρίσκεται η πρώτη μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας που έχει βρεθεί σε ασθενείς με ALS και Πάρκινσον μέχρι και σήμερα. (Wu et al., 2007)

Έχει βρεθεί επίσης, ότι ο VEGF έχει νευροπροστατευτική δράση καθώς ενισχύει την νεοαγγειακή διάχυση και έχει και άμεσες δράσεις στα νευρικά κύτταρα. Αφού η μεσολαβούμενη από την hAng μεταγραφή του rRNA είναι σημαντική για την ενεργοποίηση της αγγειογένεσης από τον VEGF, είναι πιθανό ανεπάρκεια στη λειτουργία της hAng να αλλοιώνει τις φυσιολογικές δράσεις του VEGF στους κινητήριους νευρώνες (Sheng & Xu, 2016). Από την άλλη μεριά, σε κάποιους ασθενείς με ALS βρέθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της hAng στο πλάσμα, γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει ότι ανταποκρίνεται στο στρες και δρα ως νευροπροστατευτική πρωτεΐνη (van Es et al., 2014)

1.2.5.γ Η αγγειογενίνη και άλλες ασθένειες

Η hAng συμμετέχει και σε διάφορες μη κακοήθεις παθολογικές καταστάσεις όπως η ενδομητρίωση, η περιφερειακή αγγειακή νόσος, η ασθένεια του φλεγμονώδους εντέρου (inflammatory bowel disease, IBD), η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο διαβήτης. Σε όλες αυτές τις διαταραχές η συγκέντρωση της hAng είναι αυξημένη στον ορό και συνεπώς, η ανίχνευση των αλλαγών στην συγκέντρωσή της μπορεί να είναι χρήσιμη για την παρακολούθηση της εξέλιξης των ασθενειών αυτών. (Gao & Xu, 2008)

2. Σκοπός

Η hAng συμμετέχει σε ποικίλες φυσιολογικές και μη, λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού, όπως η αγγειογένεση, η ανοσοαπόκριση, η ογκογένεση, η νευροπροστασία, ο νευροεκφυλισμός κ.α. Παρότι οι διεργασίες αυτές στο σύνολό τους είναι καλά χαρακτηρισμένες, ο ρόλος της hAng σε κάποιες από αυτές δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένος. Ακόμη, παρότι η κρυσταλλική δομή της αγγειογενίνης είναι γνωστή, δεν υπάρχουν κρυσταλλικές δομές σε σύμπλοκο με το φυσικό της υπόστρωμα, ή κρυσταλλική δομή της πιθανής ενεργής μορφής της όπου το καταλυτικό κέντρο είναι «ανοιχτό».

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση των παραγόντων που συμμετέχουν στη διατήρηση της διαμόρφωσης της έλικας 3_{10} -που εμποδίζει την πρόσδεση των πυριμιδινών συμβάλλοντας αποφασιστικά στη χαμηλή ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της hAng. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκε ένα μετάλλαγμα της hAng, στο ο-

ποίο η Q117 αντικαταστάθηκε με προλίνη. Η προλίνη είναι ένα ιδιαίτερο αμινοξύ καθώς ενώ έχει την χαρακτηριστική καρβοξυτελική ομάδα (-COOH), στη θέση της αμινοτελικής ομάδας (-NH₂) υπάρχει μια αμινική ομάδα (>C=NH). Αυτό σημαίνει ότι από την αμινοομάδα της προλίνης λείπει ένα πρωτόνιο και έτσι δε μπορεί να συνεισφέρει σε δεσμούς υδρογόνου με άλλα αμινοξικά κατάλοιπα. Επιπλέον, το άτομο αζώτου της προλίνης είναι μέρος της άκαμπτης πλευρικής της αλυσίδας, η οποία σχηματίζει ένα δακτύλιο με το α άτομο άνθρακα του αμινοξέος. Δεδομένου ότι οι α έλικες συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των αμινοομάδων και των καρβοξυλομάδων των αμινοξέων της κύριας αλυσίδας της πρωτεΐνης η προλίνη μπορεί να διαταράξει τη δομή των α-ελίκων. (Derek N. Woolfson et al. 1990). Συνεπώς αντικατάσταση της Gln117, η οποία συμμετέχει στο σχηματισμό της 3₁₀ έλικας, με προλίνη μπορεί να διαταράξει τη δομή αυτή και ενδεχομένως να συμβάλλει στη μετατόπιση της παρεμποδιστικής δομής από το ενεργό κέντρο. Μετά τη δημιουργία του συγκεκριμένου μεταλλάγματος, ακολούθησε η παραγωγή της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης σε βακτηριακά στελέχη *E. Coli*, και η πρόβλεψη της δομής της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης με χρήση υπολογιστικών μεθόδων μοντελισμού.

3.Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Συστάσεις διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία:

<u>Terrific Broth</u>	<u>S.O.C θρεπτικό</u>	<u>LB Broth</u>
Τρυπτόνη 12 gr/L	Τρυπτόνη 2% (w/v)	Τρυπτόνη 10 gr/L
Εκχύλισμα ζύμης 24 gr/L	Εκχύλισμα ζύμης 0.5% (w/v)	Εκχύλισμα ζύμης 5 gr/L
Γλυκερόλη 4 mL/L	NaCl 10 mM	NaCl 10 gr/L
KH ₂ PO ₄ 0.017M	KCl 2.5 mM	
K ₂ HPO ₄ 0.072 M	MgCl ₂ 10 mM	
	MgSO ₄ 10 mM	
	Γλυκόζη 20 mM	

<u>Διάλυμα εξισορρόπησης της στήλης SPFF pH=8</u>	<u>Διάλυμα έκλουσης της στήλης SPFF pH=8</u>	<u>Διάλυμα εξισορρόπησης της στήλης RPC 18 pH=8</u>	<u>Διάλυμα έκλουσης της στήλης RPC 18 pH=8</u>
<u>Tris 25 mM</u>	<u>Tris 25 mM</u>	<u>Τριφθοροαιθανικό οξύ 0.1% v/v</u>	<u>Τριφθοροαιθανικό οξύ 0.8% v/v</u> <u>σε ισοπροπανό-</u> <u>λη:ακετονιτρίλιο:νερό</u> <u>σε αναλογία 3:2:2</u>
<u>NaCl 200 mM</u>	<u>NaCl 800 mM</u>		

<u>Διάλυμα λύσης pH=8</u>	<u>Διάλυμα αποδιάταξης pH=8</u>	<u>Διάλυμα αναδίπλωσης pH=8</u>
EDTA 2 mM	EDTA 2mM	L- αργινίνη 500mM
Tris-HCl 50 mM	Tris-HCl 100 mM	Οξειδωμένη γλουταθειόνη 0.6mM
	Υδροχλωρική γουανιδίνη 7 M	
	Ανηγμένη γλουταθειόνη 150 mM	

3.2 Δημιουργία μεταλλάγματος με κατευθυνόμενη μεταλλαξι-γένεση

Η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (Site-Directed Mutagenesis, SDM) είναι η πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την *in vitro* εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων σε επιθυμητά γονίδια. Η SDM χρησιμοποιεί ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές σχεδιασμένους ειδικά ώστε να περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη και με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης εισαγάγει τη μετάλλαξη στο γονίδιο-στόχο. Πιο συγκεκριμένα, σημειακές μεταλλάξεις μπορούν να εισαχθούν σε γονίδια εντός πλασμιδίων με χρήση 2 εκκινητών που φέρουν την επιθυμητή μετάλλαξη και συνήθως είναι συμπληρωματικοί, δηλαδή υβριδίζονται στην ίδια ακριβώς αλληλουχία, ο ένας στην κωδική και ο άλλος στην μη κωδική αλυσίδα. Η αντίδραση ενίσχυσης γίνεται σε δυο ξεχωριστές αντιδράσεις PCR και στις δυο αντιδράσεις το εκμαγείο είναι το πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο-στόχο. Στη μια αντίδραση χρησιμοποιείται ο εκκινητής που υβριδίζεται στην κωδική αλυσίδα, και στη δεύτερη ο εκκινητής που υβριδίζεται στη μη κωδική αλυσίδα. Στη συνέχεια, γίνεται μια τρίτη αντίδραση υβριδοποίησης των ενισχυμένων προϊόντων που προέκυψαν από τις δυο πρώτες αντιδράσεις PCR (δηλαδή τις δυο αλυσίδες του πλασμιδίου) και τέλος γίνεται πέψη με το περιοριστικό ένζυμο DpnI το οποίο αναγνωρίζει και πέπτει μεθυλιωμένες βάσεις, απομακρύνοντας έτσι το DNA εκμαγείο και αφήνοντας ολόκληρο μόνο το πλασμίδιο που προέκυψε από τη διαδικασία της SDM.

Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε στην προκειμένη περίπτωση ως εκμαγείο είναι ο pET-28a στον οποίο βρίσκεται και το cDNA του γονιδίου της ανθρώπινης αγγειογενίνης (pET-28a-hAng). Η γλουταμίνη 117 αντιστοιχεί στο κωδικόνιο CAG στις θέσεις 349-351 της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδίου της αγγειογενίνης. Από τα τέσσερα κωδικόνια που κωδικοποιούν την προλίνη (CCC, CCA, CCG και CCU) επιλέχθηκε

το CCG να αντικαταστήσει το κωδικόνιο της γλουταμίνης, αφενός γιατί θα γίνει υποκατάσταση σε μια μόνο βάση, και αφετέρου γιατί με βάση μελέτες βελτιστοποίησης κωδικονίων, τα στελέχη *E. Coli* δείχνουν μεγαλύτερη προτίμηση για το συγκεκριμένο κωδικόνιο.

Πίνακας 1. Πίνακας συχνότητας χρήσης κωδικονίων από τα στελέχη *E. Coli*. Α) Το % ποσοστό αναφέρεται στη μέση συχνότητα χρήσης του κωδικονίου ανά 100 κωδικόνια. Β) Η αναλογία (ratio) αντιπροσωπεύει την αφθονία του κάθε κωδικονίου σε σχέση με όλα τα κωδικόνια για το συγκεκριμένο αμινοξύ (Maloy, S., V. Stewart, and R. Taylor. 1996. *Genetic analysis of pathogenic bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.)

CODON USAGE IN *E. COLI* GENES¹

	Codon	Amino acid ²	% ³	Ratio ⁴	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	Codon	Amino acid	%	Ratio	
U	UUU	Phe (F)	1.9	0.51	UCU	Ser (S)	1.1	0.19	UAU	Tyr (Y)	1.6	0.53	UGU	Cys (C)	0.4	0.43	U
	UUC	Phe (F)	1.8	0.49	UCC	Ser (S)	1.0	0.17	UAC	Tyr (Y)	1.4	0.47	UGC	Cys (C)	0.6	0.57	
	UUA	Leu (L)	1.0	0.11	UCA	Ser (S)	0.7	0.12	UAA	STOP	0.2	0.62	UGA	STOP	0.1	0.30	
	UUG	Leu (L)	1.1	0.11	UCG	Ser (S)	0.8	0.13	UAG	STOP	0.03	0.09	UGG	Tyr (Y)	1.4	1.00	
C	CUU	Leu (L)	1.0	0.10	CCU	Pro (P)	0.7	0.16	CAU	His (H)	1.2	0.52	CGU	Arg (R)	2.4	0.42	U
	CUC	Leu (L)	0.9	0.10	CCC	Pro (P)	0.4	0.10	CAC	His (H)	1.1	0.48	CGC	Arg (R)	2.2	0.37	
	CUA	Leu (L)	0.3	0.03	CCA	Pro (P)	0.8	0.20	CAA	Gln (Q)	1.3	0.31	CGA	Arg (R)	0.3	0.05	
	CUG	Leu (L)	5.2	0.55	CCG	Pro (P)	2.4	0.55	CAG	Gln (Q)	2.9	0.69	CGG	Arg (R)	0.5	0.08	
A	AUU	Ile (I)	2.7	0.47	ACU	Thr (T)	1.2	0.21	AAU	Asn (N)	1.6	0.39	AGU	Ser (S)	0.7	0.13	U
	AUC	Ile (I)	2.7	0.46	ACC	Thr (T)	2.4	0.43	AAC	Asn (N)	2.6	0.61	AGC	Ser (S)	1.5	0.27	
	AUA	Ile (I)	0.4	0.07	ACA	Thr (T)	0.1	0.30	AAA	Lys (K)	3.8	0.76	AGA	Arg (R)	0.2	0.04	
	AUG	Met (M)	2.6	1.00	ACG	Thr (T)	1.3	0.23	AAG	Lys (K)	1.2	0.24	AGG	Arg (R)	0.2	0.03	
G	GUU	Val (V)	2.0	0.29	GCU	Ala (A)	1.8	0.19	GAU	Asp (D)	3.3	0.59	GGU	Gly (G)	2.8	0.38	U
	GUC	Val (V)	1.4	0.20	GCC	Ala (A)	2.3	0.25	GAC	Asp (D)	2.3	0.41	GGC	Gly (G)	3.0	0.40	
	GUA	Val (V)	1.2	0.17	GCA	Ala (A)	2.1	0.22	GAA	Glu (E)	4.4	0.70	GGA	Gly (G)	0.7	0.09	
	GUG	Val (V)	2.4	0.34	GCG	Ala (A)	3.2	0.34	GAG	Glu (E)	1.9	0.30	GGG	Gly (G)	0.9	0.13	
	U				C				A				G				

Έτσι λοιπόν, έγινε αντικατάσταση της αδενίνης στο 350^ο κωδικόνιο με κυτοσίνη (A350C). Οι εκκινητές που εισήγαγαν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα Primer X και είναι οι εξής :

Πρόσθιος εκκινητής: 5'- CAGTCCATCTAGATCCGTCTATCTTCCGAAG-3'

Ανάστροφος εκκινητής: 5'- CTTCGGAAGATAGACGGATCTAGATGGACTG-3'

Η υπογραμμισμένη ακολουθία είναι αυτή που εισαγάγει την μετάλλαξη στο γονίδιο.

Όπως προαναφέρθηκε έγιναν 2 ξεχωριστές PCR όπου στην κάθε μία χρησιμοποιήθηκε ο ένας από τους 2 εκκινητές. Οι PCR έγιναν με βάση το προτεινόμενο πρωτόκολλο της εταιρίας Kapa Biosystems για το προϊόν KAPA HiFi Hot Start Ready Mix PCR kit και ο σχεδιασμός της αντίδρασης έγινε ως εξής:

Πίνακας 2 Συστάσεις αντιδραστηρίων στην αντίδραση της PCR

Συστατικά	Τελικές ποσότητες/ συγκεντρώσεις
Kapa HiFi Hotstart Buffer	2x
dNTPs	0.3mM το καθένα
Πρόσθιος εκκινητής (στην πρώτη αντίδραση)	0.3μM
Ανάστροφος εκκινητής (στην δεύτερη αντίδραση)	0.3μM
DNA	7.26 ng/μL
Kapa HiFi Hotstart DNA polymerase	0.10 u
dH ₂ O	Μέχρι τα 50 μL (τελικός όγκος αντίδρασης)

Πίνακας 3 Παράμετροι της PCR

Στάδια	Θερμοκρασία	Διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη	95°C	3 λεπτά
Αποδιάταξη	98°C	20 δευτερόλεπτα
Υβριδοποίηση	65°C	1 λεπτό
Επιμήκυνση	72°C	7 λεπτά
Τελική επιμήκυνση*	72°C	5 λεπτά

*Το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης έγινε μόνο στην τρίτη αντίδραση υβριδοποίησης των προϊόντων των δυο πρώτων PCR αντιδράσεων.

Μετά και το τέλος της τρίτης PCR έγινε πέψη του PCR προϊόντος στους 37°C για 5 ώρες με το ένζυμο DpnI σε συγκέντρωση 10u.

Τέλος έγινε κατακρήμνιση αιθανόλης έτσι ώστε να αποκτηθεί καθαρό το πλασμίδιο.

Τα στάδια της κατακρήμνισης αιθανόλης είναι τα εξής:

1. Προσθήκη 5 μL NaCl 2,5 M στα 50 μL προϊόντος αντίδρασης πέψης.
2. Προσθήκη 3 όγκων ψυχρής αιθανόλης 100% και γρήγορη ανάδευση
3. Επώση σε θερμοκρασία -80° C για 30 λεπτά
4. Φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία 4° C σε 15.000 rpm για 5 λεπτά
5. Απόρριψη υπερκειμένου και προσθήκη στο ίζημα, 200 μL ψυχρής αιθανόλης 70% (v/v)
6. Φυγοκέντρωση σε θερμοκρασία 4° C σε 15.000 rpm για 5 λεπτά
7. Απόρριψη υπερκειμένου και θέρμανση του ιζήματος σε θερμοκρασία 45° C μέχρι να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη
8. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10 μL υπερκάθαρου νερού έγχυσης.

3.2.1 Μετασχηματισμός και καλλιέργεια κυττάρων κλωνοποίησης *E. coli* XL1-Blue

Ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων *E. coli* XL1-Blue με το πλασμίδιο pET-28a hAng-Q117P έγινε με τη μέθοδο του θερμικού σοκ: σε 100μL κυττάρων προστίθεται 90 ngr πλασμιδίου. Τα κύτταρα με το πλασμίδιο επωάζονται για 30 λεπτά στον πάγο, στη συνέχεια για 45 δευτερόλεπτα στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 42°C και ξανά στον πάγο για 2 ακόμη λεπτά. Τέλος, προστίθενται 900 μL εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο S.O.C και ακολουθεί επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση σε 210 rpm. Μετά την επώαση στρώνονται καλλιέργειες βακτηρίων σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB-Άγαρ το οποίο περιέχει καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 20 μgr/mL και ακολούθησε επώαση για 17 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C. Συνολικά στρώνονται 6 τρυβλία: ανά δύο στρώνονται με: 50 μL βακτηρίων, 150 μL βακτηρίων και 200 μL βακτηρίων.

Από κάθε τρυβλίο επιλέγονται δυο αποικίες και η κάθε μια ξεχωριστά εμβολιάζεται σε 5 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB-Broth με 20μgr/mL καναμυκίνη και επωάζονται 16-18 ώρες σε θερμοκρασία 37°C, σε ανακίνηση 210 rpm. Ακολουθεί η απομόνωση του πλασμιδικού DNA για κάθε μία από τις υγρές βακτηριακές καλλιέργειες με χρήση του PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit, το οποίο χρησιμοποιεί στήλη με σφαιρίδια σιλικόνης που δεσμεύουν το DNA. Ο έλεγχος της ένθεσης του γονιδίου στο πλασμίδιο έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης ενώ ο έλεγχος της επιτυχίας της μεταλλαξιγένεσης έγινε με αλληλούχηση του πλασμιδίου.

3.2.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αгарόζης

Η πιο συχνή μορφή ηλεκτροφόρησης είναι η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αгарόζης. Η μέθοδος είναι απλή και αποτελεσματική και επιτρέπει το διαχωρισμό μορίων DNA μεγέθους από 500 bp έως 25 kb. Η αгарόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές που προέρχεται από φύκη (red algae). Τα πηκτώματα αгарόζης φέρουν ευμεγέθεις πόρους και είναι κατάλληλα για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA. Η ανίχνευση των μορίων στην πηκτή γίνεται με τη χρήση της χρωστικής Midori Green, με την οποία επωάζεται η πηκτή, προτού αρχίσει η πήξη της, σε αναλογία 1:10. Η χρωστική Midori Green εκπέμπει φθορισμό μετά την πρόσδεσή της σε μόρια DNA.

Για τη δημιουργία του πηκτώματος αναμιγνύεται αгарόζη σε σκόνη με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x (0.484 % (w/v) Tris, 0,12 % (w/w) οξικό οξύ και 1mM EDTA) και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αгарόζη. Το πήκτωμα αгарόζης που παρασκευά-

ζεται έχει συγκέντρωση αγαρόζης τέτοια, ώστε να είναι κατάλληλη η πυκνότητά του για το διαχωρισμό του επιθυμητού μεγέθους μορίων DNA. Λίγο πριν κρυώσει η αγαρόζη, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα χρωστικής Midori Green. Όταν κρυώσει η αγαρόζη δημιουργεί ένα πήκτωμα, καθώς δεσμοί υδρογόνου συνδέουν τα μόρια της αγαρόζης. Το πήκτωμα μαζί με τα μόρια του DNA εμβαπτίζεται στο λουτρό ηλεκτροφόρησης σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (TAE 1x) και με τη βοήθεια τροφοδοτικού εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται οδηγεί τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA να κινηθούν προς την κάθοδο. Η ηλεκτρική τάση ασκείται για το βέλτιστο χρόνο που απαιτείται για το διαχωρισμό των μορίων του DNA (Voytas, 2001).

3.3 Υπερέκφραση της ανθρώπινης αγγειογενίνης

Πίνακας 4 .Διακριτική ικανότητα πηκτωμάτων αγαρόζης

% (w/v) πήκτωμα αγαρόζης	Εύρος διακριτικής ικανότητας	Παρατηρήσεις
0,5	1 kb έως 30 kb	Πηκτώματα χαμηλής συγκέντρωσης – ευνοείται ο διαχωρισμός μεγάλων τμημάτων DNA
0,7	800 bp έως 12 kb	
1,0	500 bp έως 10 kb	
1,2	400 bp έως 7 kb	Πηκτώματα υψηλής συγκέντρωσης – ευνοείται ο διαχωρισμός μικρών τμημάτων DNA
1,5	200 bp έως 3 kb	
2,0	50 bp έως 2 kb	

3.3.1 Μετασχηματισμός κυττάρων υπερέκφρασης *E. coli* BL21-Gold και υπερέκφραση της αγγειογενίνης

Η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης αγγειογενίνης έγινε με βάση το πρωτόκολλο του Holloway D.E. και των συνεργατών του. (Holloway *et al.*, 2001) Το πλασμίδιο pET-28a hAng-Q117P εισήχθη σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* BL21-Gold με τη μέθοδο θερμικού σοκ. Για κάθε υγρή καλλιέργεια γίνεται επιλογή μίας μοναδιαίας στικτής αποικίας από το τρυβλίο και εμβολιάζεται σε σωληνάριο τύπου falcon με υγρό θρεπτικό μέσο LB-Broth 5-15 ml, στο οποίο έχει προστεθεί καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 50 µgr/mL και θα επωάζεται για 16 ώρες σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (210 rpm) Μετά το πέρας της επώασης και εφόσον έχουν αναπτυχθεί τα κύτταρα, ακολουθεί ανακαλλιέργεια σε μεγαλύτερη κλίμακα. Πιο συγκεκριμένα σε 500 mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου TB Broth, στο οποίο έχει προστεθεί καναμυκίνη με τελική συγκέντρωση 50 µg/mL, θα εμβολιαστούν με 1/100 από μία υγρή καλλιέργεια και θα επωαστούν σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (210 rpm), ώπου η οπτική απορρόφηση της οπτικής πυκνότητας να είναι OD_{600nm}=0,6-0,8 όπου και θεωρείται ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Ακολουθεί προσθήκη IPTG (ε-

παγωγέας υπερέκφρασης του γονιδίου του πλασμιδίου) σε τελική συγκέντρωση 1 mM και επώαση σε θερμοκρασία 37° C υπό ανάδευση (210 rpm) για δύο επιπλέον ώρες. Τέλος, γίνεται η συλλογή των κυττάρων έπειτα από φυγοκέντρωση σε 5000g, σε θερμοκρασία 4 °C, για 45 λεπτά.

3.4 Απομόνωση και καθαρισμός της μεταλλαγμένης αγγειογενίνης

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την Απομόνωση και τον καθαρισμό της μεταλλαγμένης αγγειογενίνης βασίστηκε στο πρωτόκολλο του Holloway D.E και των συνεργατών του. (Holloway, Hares, Shapiro, Subramanian, & Acharya, 2001) Η διαδικασία έγινε ως εξής:

1. Λύση του ιζήματος από 500 mL βακτηριακής καλλιέργειας:

- Επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 25 mL διαλύματος λύσης.
- Περαιτέρω σπάσιμο των κυττάρων με χρήση υπερήχων για 5 κύκλους των 40 δευτερολέπτων.
- Φυγοκέντρωση για 20 λεπτά σε 20.000 g και σε θερμοκρασία 4°C.
- Απόρριψη του υπερκειμένου.
- Επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας άλλες δυο φορές, με τη δεύτερη φορά να γίνεται προσθήκη Triton X-100 στο διάλυμα λύσης, σε τελική συγκέντρωση 1 % (v/v).

Οι παραπάνω διεργασίες εκτελούνται σε θερμοκρασία 4°C.

2. Διάσπαση σωματίων εγκλεισμού.

Τα σωματία εγκλεισμού είναι δομές που σχηματίζουν οι αδιάλυτες πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Ο σχηματισμός των σωματίων εγκλεισμού μπορεί να είναι αποτέλεσμα υπερπαραγωγής μιας πρωτεΐνης σε ένα βακτηριακό σύστημα υπερέκφρασης. Μετά την τελευταία φυγοκέντρωση, το ίζημα στο οποίο υπάρχουν τα σωματία εγκλεισμού επαναδιαλύεται σε 15 mL διάλυμα επαναδιάταξης και με τη χρήση ομογενοποιητή υφίσταται μηχανική πίεση, ώστε να σπάσουν τα σωματία εγκλεισμού. Μετά την ομογενοποίηση το διάλυμα ανακινείται για δυο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με χρήση του μηχανήματος Stuart Tube Rotator.

3. Αναδίπλωση της αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης.

-Το δείγμα εισάγεται σταγόνα-σταγόνα σε 500 mL διαλύματος αναδίπλωσης και αναδεύεται πολύ αργά σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά το πέρας 24 ωρών, φυγοκε-

ντρείται σε 10.000 g, σε θερμοκρασία 25 °C, για 30 λεπτά και το υπερκείμενο αραιώνεται τρεις φορές σε απαερωμένο νερό έγχυσης.

4. Χρωματογραφικός καθαρισμός της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης με χρήση του συστήματος FPLC.

Ο καθαρισμός της αγγειογενίνης γίνεται με τη χρήση δυο διαδοχικών χρωματογραφικών στηλών.

Η πρώτη στήλη είναι μια κατιοανταλλακτική ρητίνη, η στήλη SP-Sepharose Fast Flow όγκου 20 mL. Η εξισορρόπηση της γίνεται με 5 όγκους στήλης διαλύματος έκλουσης και στη συνέχεια με 5 όγκους στήλης διαλύματος εξισορρόπησης. Με την διέλευση του πρωτεϊνικού δείγματος από την στήλη, οι θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες του δείγματος, συμπεριλαμβανομένου και της αγγειογενίνης, δεσμεύονται από τις ισχυρά αρνητικά φορτισμένες ομάδες της ρητίνης. Μόλις περάσει στη στήλη όλο το δείγμα, γίνεται έκπλυση της στήλης με 5 όγκους διαλύματος εξισορρόπησης έτσι ώστε να αποσυνδεθούν οι μη ειδικά συνδεδεμένες πρωτεΐνες από τη στήλη. Ακολουθεί έκλυση των συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών με 100% διάλυμα έκλουσης και συλλέγονται κλάσματα όγκου 4 mL. Σύμφωνα με την τιμή απορρόφησης στα 280 nm συλλέγονται και ενώνονται τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη μας, έτσι ώστε να εφαρμοστούν στη δεύτερη στήλη.

Η δεύτερη χρωματογραφική στήλη είναι μια στήλη αντίστροφης φάσης RPC 18 όγκου 3 mL, στην οποία η στατική φάση είναι πιο υδρόφοβη από την κινητή και δεσμεύει με μεγαλύτερη συγγένεια υδροφοβικά και λιγότερο πολικά μόρια. Τα προσδεδεμένα στη στήλη μόρια εκλούνται με μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης μέσω αύξησης της συγκέντρωσης ενός οργανικού διαλύτη. Η εξισορρόπηση της στήλης γίνεται με 10 όγκους στήλης διαλύματος εξισορρόπησης και στη συνέχεια με 5 όγκους στήλης διαλύματος έκλουσης. Μόλις περάσει το δείγμα από τη στήλη γίνεται έκπλυση της στήλης με 25% διαλύματος έκλουσης για 5 όγκους στήλης, ώστε να απομακρυνθούν οι μη ειδικά συνδεδεμένες πρωτεΐνες. Τέλος, γίνεται έκλυση της αγγειογενίνης με διαβάθμιση συγκέντρωσης από 25% έως 45% του διαλύματος έκλουσης για 16 λεπτά.

Διαπίδυση και συμπύκνωση της αγγειογενίνης

- Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη συλλέγονται, ενώνονται και μεταφέρονται σε μεμβράνη διαπίδυσης 7.000 cut off σε υπερκάθαρο ύδωρ έγχυσης ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα έκλουσης στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη και να αντικατασταθεί με υπερκάθαρο νερό έγχυσης. Για τον λόγο αυτό η μεμβράνη διαπίδυσης που περιέχει το πρωτεϊνικό

διάλυμα μεταφέρεται σε 1L υπερκάρθρου νερού έγχυσης και επωάζεται για 16 ώρες σε θερμοκρασία 4°C υπό ανάδευση με την βοήθεια stirrer. Μετά το πέρας των 16 ωρών γίνεται αλλαγή στο υπερκάρθρο νερό και η μεμβράνη επωάζεται στις ίδιες συνθήκες για άλλες 3 ώρες. Στη συνέχεια γίνεται συμπύκνωση σε τελική συγκέντρωση 20 mg/mL με τη χρήση του συστήματος φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό. Τέλος, η πρωτεΐνη μοιράζεται σε κλάσματα των 20 µL και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -80°C.

3.4.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες και χρώση της πηκτής

Μετά το τέλος της απομόνωσης και του χρωματογραφικού καθαρισμού της μεταλλαγμένης αγγειογενίνης, έγινε έλεγχος του κάθε σταδίου του καθαρισμού, αλλά και της τελικής καθαρότητας της απομονωμένης πρωτεΐνης με τη χρήση της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια σχετικά απλή, γρήγορη και πολύ ευαίσθητη μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη των ιδιοτήτων των πρωτεϊνών. Η τεχνική διαχωρισμού των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση βασίζεται στο γεγονός ότι φορτισμένα μόρια θα μετακινηθούν κατά μήκος ενός πηκτώματος, όταν σε αυτό εφαρμοσθεί ηλεκτρικό πεδίο, το οποίο παρέχεται συνήθως από ηλεκτρόδια. Εάν τα μόρια που πρόκειται να διαχωριστούν, φορτιστούν με το ίδιο ακριβώς φορτίο, τότε ο διαχωρισμός τους θα γίνει με βάση το μοριακό τους βάρος και η κινητικότητα τους θα είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους. Με βάση αυτό το γεγονός στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης, οι πρωτεΐνες φορτίζονται αρνητικά καθώς το ανιονικό απορρυπαντικό SDS (δωδεκυλοθειικό νάτριο) προσδένεται σε αυτές μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, και έτσι οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται μέσα σε μία μήτρα από γέλη πολυακρυλαμίδιου σε ένα ηλεκτρικό πεδίο σύμφωνα μόνο με το μοριακό τους βάρος. Η SDS-PAGE μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση του μεγέθους, της ποσότητας, της καθαρότητας και του ισοηλεκτρικού σημείου πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών.

Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για να σχηματιστεί το πολυακρυλαμίδιο είναι το μονομερές ακρυλαμίδιο και το δις-ακρυλαμίδιο. Η αντίδραση πολυμερισμού των 2 αυτών συστατικών για το σχηματισμό του πολυακρυλαμίδιου πυροδοτείται είτε από χημικά είτε από φωτοχημικά συστήματα παραγωγής ελευθέρων ριζών. Ο χημικός πολυμερισμός ξεκινά από το TEMED (τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη) και το APS (υπερθειικό αμμώνιο). Όταν το APS διαλύεται στο νερό σχηματίζει ελεύθερες ρίζες υπερθειικού οι οποίες ενεργοποιούν το μονομερές ακρυλαμίδιο. Το TEMED προστίθεται ως καταλύτης για να επιταχύνει την α-

ντίδραση πολυμερισμού λόγω της ικανότητάς του να μεταφέρει ηλεκτρόνια. Το ενεργοποιημένο ακρυλαμίδιο στη συνέχεια αντιδρά με τα υπόλοιπα μονομερή σχηματίζοντας μια μακρία αλυσίδα. Οι επιμηκυνόμενες αλυσίδες πολυμερών διασταυρώνονται τυχαία με το δι-ακρυλαμίδιο, ώστε να σχηματίσουν ένα δίκτυο από αλυσίδες ακρυλαμιδίου. Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το APS και η καταλυτική δράση του TEMED είναι απαραίτητα στοιχεία για την εκκίνηση του πολυμερισμού, καθώς το ακρυλαμίδιο δεν αντιδρά με τον εαυτό του ή με το δι-ακρυλαμίδιο (B. D. Hames, 1988)

Στις περισσότερες περιπτώσεις η ηλεκτροφόρηση επιτελείται σε δύο διαδοχικές πηκτές: μία πηκτή επιστοιβάξης (stacking gel), στην οποία τοποθετούνται τα δείγματα και μία πηκτή διαχωρισμού (separating gel), η οποία βρίσκεται ακριβώς κάτω από την πηκτή επιστοιβάξης. Η πηκτή επιστοιβάξης εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φθάσουν ταυτόχρονα στην κυρίως πηκτή διαχωρισμού.

Μετά την ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει ανίχνευση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών με χρώση της πηκτής με το Coomassie Brilliant Blue R-250, η οποία γίνεται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον που ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη χρωστική και τις αμινομάδες των πρωτεϊνών.

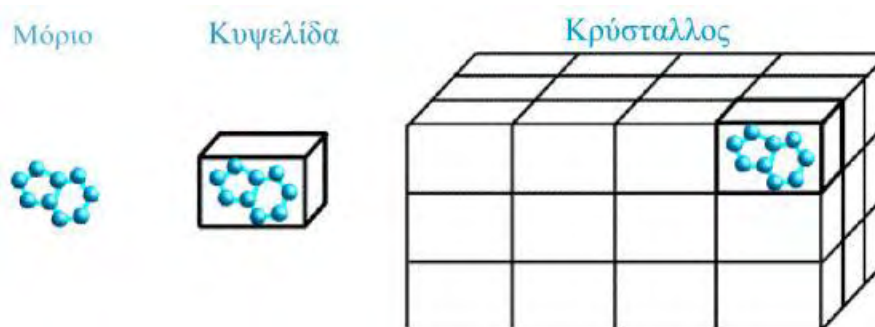
3.5 Κρυσταλλογραφία

3.5.1 Κρύσταλλοι πρωτεϊνών

Κρύσταλλος είναι μία φάση της στερεάς κατάστασης που χαρακτηρίζεται από την επαναλαμβανόμενη διευθέτηση των ατόμων ή των μορίων που αποτελούν τον κρύσταλλο σε τρεις διαστάσεις. Ο κρύσταλλος δημιουργείται από την επανάληψη ενός βασικού μοτίβου που έχει το σχήμα παραλληλόγραμμου με πλευρές a , b , c και ονομάζεται στοιχειώδης κυψελίδα. Οι κυψελίδες που αποτελούν τον κρύσταλλο είναι πανομοιότυπες σε διαστάσεις και περιεχόμενο, έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και επαναλαμβάνονται με απλή μετάθεση, δηλαδή χωρίς περιστροφή, στις τρεις διαστάσεις, ώστε να δημιουργούν ένα κανονικό τριδιάστατο πλέγμα. Συνήθως, η κάθε κυψελίδα αποτελείται από δύο ή περισσότερα μόρια συνδεδεμένα με κάποιο είδος συμμετρικής διευθέτησης, έτσι ώστε να συμπληρώνουν το χώρο ικανοποιητικά.

Οι αλληλεπιδράσεις που κρατούν τις πρωτεΐνες στο κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική μονάδα μορίων που περιέχεται στη στοιχειώδη κυψελίδα του κρυσταλλικού πλέγματος. Οι κρύσταλλοι αποτε-

λούνται από τη στερεή φάση, δηλαδή τα σημεία επαφής των μακρομορίων που δημιουργεί το κρυσταλλικό πλέγμα και από την υγρή, που συμπληρώνει τα κενά μεταξύ του πλέγματος. Απαιτείται η μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα των πρωτεϊνών για τα πειράματα κρυστάλλωσης, καθώς η ανομοιογένεια λόγω βιοχημικών τροποποιήσεων (πρωτεόλυση, φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση) ή άλλων παραγόντων οδηγεί τις πρωτεΐνες να μην κρυσταλλώνονται ή να κρυσταλλώνονται δύσκολα.



Εικόνα 5 Απλουστευμένη αναπαράσταση των κυψελίδων που συγκροτούν έναν κρύσταλλο.

3.5.2 Ανάπτυξη κρυστάλλων

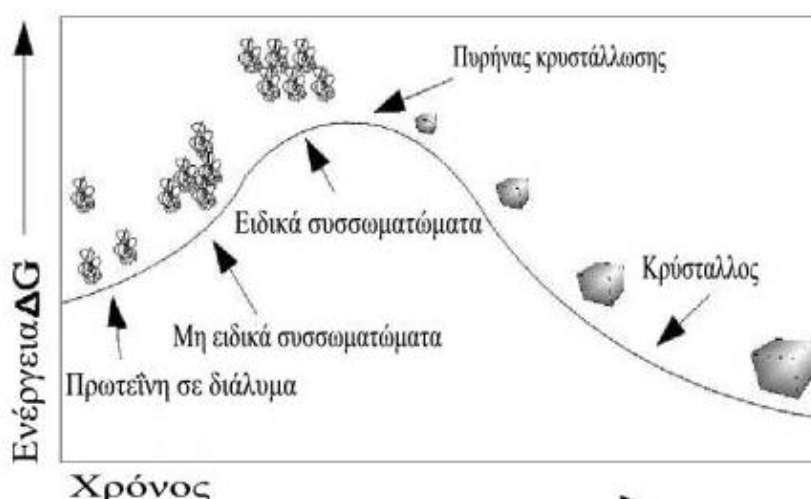
Για να επιτευχθεί η κρυστάλλωση είναι απαραίτητο να δημιουργηθεί κατάσταση υπερκορεσμού του πρωτεϊνικού μορίου σε ένα διάλυμα. Οι καταστάσεις υπό και υπερκορεσμού καθορίζονται από τη διαλυτότητα των μακρομορίων στα διαγράμματα διαλυτότητας, όπου παράμετροι όπως η ιοντική ισχύς, το pH, η θερμοκρασία, η φύση των διαλυτών παραμένουν σταθερές. Η καμπύλη διαλυτότητας ορίζει τις ζώνες υποκορεσμού και υπερκορεσμού και καθορίζει την κατάσταση εξισορρόπησης μεταξύ κορεσμένης πρωτεΐνης και κρυσταλλωμένης πρωτεΐνης στο διάλυμα. Κάτω από την καμπύλη κορεσμού η πρωτεΐνη δεν μπορεί να κρυσταλλωθεί. Όταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι υψηλότερη από την συγκέντρωση εξισορρόπησης για δεδομένη συγκέντρωση ηλεκτρολύτη επέρχεται η κατάσταση υπερκορεσμού η οποία υποδιαιρείται σε τρεις ζώνες:

1. Ζώνη κατακρήμνισης: Η πρωτεΐνη μετατρέπεται σε άμορφη μάζα. Αυτό συμβαίνει όταν η κατάσταση υπερκορεσμού προσεγγίζεται με μεγάλη ταχύτητα με αποτέλεσμα τα πρωτεϊνικά μόρια να μην έχουν τον απαιτούμενο χρόνο να αλληλεπιδράσουν με τα γειτονικά τους και να διευθετηθούν κατάλληλα στο χώρο.

2. Ζώνη πυρήνωσης: Σχηματίζονται οι πυρήνες κρυστάλλωσης. Πυρήνες κρυστάλλωσης ονομάζονται οι πιο μικρές οργανωμένες μορφές πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και σχηματίζονται στην περιοχή όπου η περίσσεια της πρωτεΐνης παίρνει κρυσταλλική μορφή.

3. Μετασταθερή ζώνη: Η ζώνη αύξηση κρυστάλλων. Η ζώνη αυτή αντιστοιχεί ιδανικά στην αύξηση κρυστάλλων από πυρήνες κρυστάλλωσης που προϋπάρχουν χωρίς τη δημιουργία νέων. Καθώς το μέγεθος των κρυστάλλων αυξάνει, η συγκέντρωση της διαλυμένης πρωτεΐνης μειώνεται, με αποτέλεσμα η μετασταθερή ζώνη να μετατοπίζεται.

Για την κρυσταλλογραφική μελέτη μίας πρωτεΐνης απαιτούνται μεγάλοι και καλοσχηματισμένοι κρύσταλλοι, για αυτό σε πρώτη φάση πρέπει να δημιουργηθούν πυρήνες κρυστάλλωσης και να αφεθούν στην μετασταθερή ζώνη για να μεγαλώσουν. Αυτό προϋποθέτει ότι η πρωτεΐνη θα υπερβεί ένα φράγμα ενέργειας προκειμένου να μπορέσει να κρυσταλλωθεί, όπως φαίνεται στην εικόνα 5



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση της ελεύθερης ενέργειας σε σχέση με τον χρόνο κατά τα διάφορα στάδια της κρυστάλλωσης

Πιο συγκεκριμένα, το διάλυμα της πρωτεΐνης πρέπει να περάσει από τη διαλυτή φάση στη ζώνη πυρήνωσης και να παραμείνει εκεί για σύντομο χρονικό διάστημα έτσι ώστε να μη δημιουργηθούν πολλοί πυρήνες κρυστάλλωσης που οδηγούν σε πολλούς και μικρότερου όγκου κρυστάλλους. Στη συνέχεια, όταν το πρωτεϊνικό διάλυμα μεταπέσει στη μετασταθερή ζώνη, οι πυρήνες θα συνεχίσουν να μεγαλώνουν και θα δώσουν κρυστάλλους.

Στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας, για την ανάπτυξη κρυστάλλων της μεταλλαγμένης αγγειογενίνης, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της καθημένης σταγόνας. Στη μέθοδο αυτή αναμιγνύονται ίσοι όγκοι πρωτεΐνης (πρωτεϊνικό διάλυμα συγκέντρωσης 15 mg/mL)

και διαλύματος εξισορρόπησης (0.2% νατραζίδιο, 20% (v/v) PEG-300, 150mM μηλεϊνικό οξύ), 2 mL από το κάθε ένα. Η σταγόνα (4μL) τοποθετείται πάνω από το διάλυμα εξισορρόπησης όγκου 700 μL, το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς και αφήνεται να ισορροπήσει σε θερμοκρασία 16°C.

3.6 Πρόβλεψη της δομής του μεταλλάγματος Q117P με συγκριτικό σχεδιασμό με βάση την ομολογία

Ο όρος συγκριτικός σχεδιασμός με βάση την ομολογία (homology modelling), ή αλλιώς συγκριτικός σχεδιασμός, περιγράφει την *in silico* διαδικασία κατασκευής ενός τριδιάστατου δομικού μοντέλου της πρωτεΐνης-στόχου, με χρήση της αμινοξικής της αλληλουχίας και τα πειραματικά δεδομένα τρισδιάστατης δομής μιας ομόλογης πρωτεΐνης. Ο συγκριτικός σχεδιασμός στηρίζεται στην εύρεση μίας ή περισσότερων γνωστών πρωτεϊνικών δομών των οποίων η αλληλουχία να μοιάζει με την αλληλουχία της πρωτεΐνης-στόχου. Συχνά τέτοιες πρωτεΐνες, είναι πρωτεΐνες που ανήκουν εξελικτικά στην ίδια οικογένεια με την πρωτεΐνη-στόχο. Η τακτική αυτή βασίζεται στην παρατήρηση ότι πρωτεΐνες που ανήκουν στην ίδια οικογένεια και έχουν παρόμοια αμινοξική αλληλουχία, έχουν και παρόμοιες τρισδιάστατες δομές. Στην πραγματικότητα, ο βαθμός συντήρησης της πρωτεϊνικής τρισδιάστατης δομής μεταξύ των μελών της ίδιας οικογένειας, είναι πολύ υψηλότερος σε σχέση με αυτόν της αμινοξικής αλληλουχίας. (Chothia & Lesk, 1986) (Kaczanowski & Zielenkiewicz, 2009). Οι αμινοξικές αλληλουχίες των δυο πρωτεϊνών στοιχίζονται έτσι ώστε να γίνει αντιστοίχιση των αμινοξέων της πρωτεΐνης-στόχου με τα αντίστοιχα αμινοξέα της πρωτεΐνης-πρότυπο. Η ευθυγραμμισμένη πλέον αλληλουχία της πρωτεΐνης-στόχου και η δομή της πρωτεΐνης-πρότυπου χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενός δομικού μοντέλου της πρωτεΐνης-στόχου. Η ποιότητα του δομικού μοντέλου που προκύπτει εξαρτάται από την ποιότητα της στοίχισης της αλληλουχίας αλλά και της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης-πρότυπου. Το χτίσιμο της δομής μπορεί να περιπλακεί περαιτέρω από την παρουσία κενών στην στοίχιση τα οποία συνήθως υποδηλώνουν μια δομική περιοχή που υπάρχει στην πρωτεΐνη-στόχο αλλά όχι στην πρωτεΐνη-πρότυπο. Παρ' όλα αυτά, όταν η πρωτεΐνη-στόχος και η πρωτεΐνη-πρότυπο είναι πολύ συγγενικές, ο συγκριτικός σχεδιασμός μπορεί να παράξει υψηλής ποιότητας δομικά μοντέλα. Τα προκύπτοντα δομικά μοντέλα μπορούν να βοηθήσουν στον εντοπισμό των καλά συντηρημένων αμινοξέων, να δώσουν σημαντικές πληροφορίες για την χωροταξική διάταξη των αμινοξέων αυτών και να απαντήσει σε ερωτήματα όπως το εάν ένα συγκεκριμένο κατάλοιπο διατηρείται για να σταθεροποιήσει την αναδίπλωση της πρωτεΐνης, να συμμετάσχει στη δέσμευση μικρών μορίων ή να υποβοηθά τη σύνδεση με άλλες πρωτεΐνες ή νουκλεϊκά οξέα. Όλα αυτά τα δεδομένα μπορούν να οδηγήσουν στον σχεδιασμό νέων πειραμάτων αλλά και να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση νέων προσδετών των υπό-μελέτη πρωτεϊνών.

Για να είναι η προκύπτουσα τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης-στόχου, όσο πιο κοντά γίνεται στα πειραματικά δεδομένα και κατ' επέκταση να είναι πιο πιθανό η δομή αυτή να υπάρχει έτσι και στη φύση χρειάζονται κάποια παραπάνω βήματα πέρα από την αρχική α-

ντιστοίχιση αλληλουχίας. Η πρώτη δομή που δημιουργείται υπόκειται σε διαδικασία ελαχιστοποίησης ενέργειας κατά την οποία συνήθως ο σκελετός της πρωτεΐνης παραμένει σταθερός και για όλο το υπόλοιπο σύστημα πρωτεΐνης (πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων) – νερού- ιόντων ελαχιστοποιείται η δυναμική του ενέργεια. Στον τομέα των υπολογιστικών βιοεπιστημών, η ελαχιστοποίηση της ενέργειας (που ονομάζεται επίσης βελτιστοποίηση ενέργειας) είναι η διαδικασία εύρεσης μιας διάταξης στο χώρο ενός συνόλου ατόμων όπου, σύμφωνα με κάποιο υπολογιστικό μοντέλο χημικής σύνδεσης η δυναμική ενέργεια για κάθε άτομο είναι με αποδεκτό τρόπο κοντά στο μηδέν. Στη συνέχεια η δομή που προκύπτει υφίσταται προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής ώστε να δημιουργηθεί η τελική και αποδεκτή τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης-στόχου.

3.6.1 Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής

Οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Molecular dynamics simulations, MD) αναφέρονται σε μια υπολογιστική μέθοδο προσομοίωσης για την μελέτη των φυσικών κινήσεων των ατόμων και των μορίων που λαμβάνουν χώρα συναρτήσει του χρόνου, σε ένα μοριακό σύστημα. Τα μακρομόρια, και συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες, εμφανίζουν ένα μεγάλο εύρος χαρακτηριστικών κινήσεων, από τις ατομικές ταλαντώσεις που είναι πολύ γρήγορες (femtoseconds) και πολύ εντοπισμένες, έως τις αργές κινήσεις που γίνονται στην κλίμακα ολόκληρου του μορίου, όπως μία αναδίπλωση (microseconds-milliseconds). Μια προσομοίωση μοριακής δυναμικής αποτελείται από την αριθμητική επίλυση των κλασικών εξισώσεων της κίνησης. Προκειμένου να συμβεί αυτό, χρησιμοποιούνται νόμοι που χαρακτηρίζουν πώς αλληλοεπιδρούν τα άτομα μεταξύ τους μέσα στο σύστημα. Αυτοί οι νόμοι σε συνδυασμό με τις θέσεις των ατόμων μπορούν να αποδώσουν τη σχετική δυναμική ενέργεια, τις δυνάμεις που ασκούνται στα άτομα και την πίεση στα τοιχώματα του υποθετικού δοχείου στο οποίο ευρίσκεται το μοριακό σύστημα. Είναι επίσης απαραίτητη η ύπαρξη ενός αλγορίθμου που να ενσωματώνει τις εξισώσεις κίνησης των ατόμων του συστήματος. Για να λυθούν οι εξισώσεις αυτές, πρέπει να παρέχονται στα υπολογιστικά προγράμματα και αρχικές τιμές, όπως αρχικές θέσεις και ταχύτητες για κάθε άτομο στο μοριακό σύστημα. Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες αναλύσεων μοριακής δυναμικής, ανάλογα με το μοντέλο που επιλέγεται για να αναπαραστήσει ένα φυσικό σύστημα: α) οι αναλύσεις που χρησιμοποιούν τους νόμους της κλασικής μηχανικής και β) οι αναλύσεις που λαμβάνουν υπ' όψη τους την κβαντομηχανική φύση του χημικού δεσμού. Προς το παρόν, μόνο η κλασική μοριακή δυναμική είναι πρακτικά εφαρμόσιμη σε προσομοιώσεις βιομοριακών συστημάτων. Στην κλασική μοριακή δυναμική, η δυναμική κίνηση ενός μοριακού συστήματος αξιολογείται από τη συνολική του ενέργεια. Σύμφωνα με το νόμο του Hook, η συνολική ενέργεια ενός μικρού και απλού διατομικού μορίου δίνεται από τους τύπους:

$$E(r) = \frac{1}{2}k(r - r^0)^2 \quad F(r) = -\frac{dE}{dr} = -k(r - r^0)$$

Όπου: E είναι η ενέργεια, F είναι η δύναμη r και r^0 είναι η απόσταση και η αρχική απόσταση αντίστοιχα και k η σταθερά του Hook

Εδώ οι δυνάμεις που ασκούνται σε κάθε άτομο υπολογίζονται από την πρώτη παράγωγο της δυναμικής ενέργειας, ως προς τη θέση του ατόμου. Αφού κατανεμηθούν οι δυνάμεις,

χρησιμοποιείται ο δεύτερος νόμος του Νεύτωνα που ορίζει ότι η δύναμη f ισούται με τη μάζα m επί την επιτάχυνση a .

Στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, η κινητική ενέργεια του συστήματος εξαρτάται από τη θερμοκρασία του συστήματος και η ενέργεια είναι το άθροισμα των κινητικών και δυναμικών συνιστωσών του συστήματος. Η επιτάχυνση κάθε ατόμου εκτιμάται από το σύνολο των δυνάμεων που δέχεται, σε συγκεκριμένο δυναμικό πεδίο.

Η μοριακή δυναμική λοιπόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την περαιτέρω βελτιστοποίηση ενός μοντέλου που παράγεται από τον μοντελισμό ομολογίας, καθώς και για την βελτιστοποίηση αποτελεσμάτων ελλιμενισμού, όπου οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-προσδέτη αναλύονται ως προς την σταθερότητά τους. (Vlachakis, Bencurova, Papangelopoulos, & Kossida, 2014)

3.6.2 Μεθοδολογία

Στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε ο συγκριτικός σχεδιασμός ώστε να κατασκευαστεί το δομικό μοντέλο του μεταλλάγματος Q117P της αγγειογενίνης. Ως πρότυπη τριδιάστατη δομή, πάνω στην οποία χτίστηκε το δομικό μοντέλο, χρησιμοποιήθηκε η δομή της φυσιολογικής ανθρώπινης αγγειογενίνης που έχει αποκαλυφθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ. Η δομή αποκτήθηκε από την protein data bank και είναι η δομή με αριθμό καταχώρησης 5EOP. Για το χτίσιμο της δομής χρησιμοποιήθηκε αρχικά το πρόγραμμα VMD (Visual Molecular Dynamics) και στη συνέχεια με τη βοήθεια των προγραμμάτων psfgen και NAMD (Nanometer Molecular Dynamics) έγινε ελαχιστοποίηση ενέργειας και πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής πρώτα με σταθερή πίεση και στη συνέχεια με σταθερό όγκο και μεταβολή θερμοκρασίας από τους 0°C στους 4°C. Το σύστημα που υποβλήθηκε σε προσομοίωση περιελάμβανε εκτός από την πρωτεΐνη, 5890 μόρια νερού καθώς και 17 ιόντα Na^+ και 25 ιόντα Cl^- . Τα ιόντα προστέθηκαν πρώτον για εξουδετέρωση του ηλεκτρικού φορτίου της πρωτεΐνης και δεύτερον, για να προσομοιωθεί συγκέντρωση NaCl 0,15 M. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε τοποθέτηση ενός δινουκλεοτιδίου (C-U) στην δομή της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης που προέκυψε από τις προηγούμενες διεργασίες, καθώς και στην δομή αγρίου τύπου. Οι δύο δομές μαζί με τον προσδέτη υποβλήθηκαν εκ νέου σε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για 40 ns στους 277 K.

Το πρόγραμμα VMD

Το VMD είναι ένα υπολογιστικό πρόγραμμα διαδραστικής οπτικοποίησης βιοπολυμερών, όπως πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, λιπιδίων και μεμβρανών. Χρησιμοποιείται ως εργαλείο οπτικοποίησης και ανάλυσης των αποτελεσμάτων των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής αλλά και πειραματικών δεδομένων όπως αρχεία από την protein data bank. (Humphrey et al., 1996)

Το πρόγραμμα psfgen

Για να πραγματοποιηθεί η ελαχιστοποίηση της ενέργειας αλλά και η προσομοίωση μοριακής δυναμικής, είναι απαραίτητες οι πληροφορίες για τον τρόπο σύνδεσης όλων των ατόμων της πρωτεΐνης. Στο αρχείο pdb το οποίο είναι αυτό που χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση και το αρχικό χτίσιμο της δομής, δεν περιέχονται τέτοιες πληροφορίες, παρά μό-

νο οι συντεταγμένες των ατόμων της πρωτεΐνης. Από το αρχείο pdb λείπουν επίσης και τα υδρογόνα. Για τον λόγο αυτό πρέπει να δημιουργηθεί ένα αρχείο psf, που να περιέχει αυτές τις πληροφορίες συμπεριλαμβανομένων και των υδρογόνων. Το αρχείο αυτό δημιουργείται από το πρόγραμμα psfgen με βάση το αρχικό αρχείο pdb και ένα αρχείο τοπολογίας. Το πρόγραμμα psfgen στη συνέχεια δημιουργεί δυο νέα αρχεία, ένα αρχείο pdb και ένα αρχείο psf, τα οποία είναι αυτά που χρησιμοποιούνται στις μετέπειτα διαδικασίες.

Το πρόγραμμα NAMD

Το πρόγραμμα NAMD είναι ένα υπολογιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιείται για να εφαρμοστεί ελαχιστοποίηση ενέργειας σε ένα βιομοριακό σύστημα αλλά κυρίως χρησιμοποιείται για προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής. (Phillips et al., 2005)

Υπολογισμός RMSD

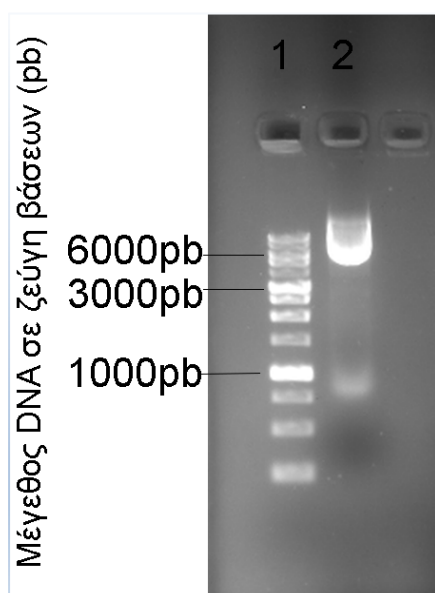
Μια από τις παραμέτρους που χρησιμοποιούνται ως μέτρο της μεταβολής της δομής σε σχέση με την αρχική δομή συναρτήσει του χρόνου, είναι το RMSD (root mean square deviation). Σε ένα διάγραμμα, μπορεί να αναπαρασταθεί η μεταβολή του RMSD για κάθε στιγμιότυπο της προσομοίωσης.

$$RMS = \left\langle \left(r_i^{\alpha} - r_i^{\beta} \right)^2 \right\rangle^{\frac{1}{2}} = \sqrt{\frac{1}{N_i} \sum_i \left(r_i^{\alpha} - r_i^{\beta} \right)^2}$$

Εξίσωση RMSD, όπου r_i^{α} είναι η θέση του ατόμου i στην δομή α , ενώ το r_i^{β} είναι η θέση του ίδιου ατόμου στην δομή β και N είναι το πλήθος των ατόμων.

4.Αποτελέσματα

4.1 Αποτελέσματα κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης Q117P.



Εικόνα 7 Αποτελέσματα από πηκτή αгарόζης 1%. Στη διαδρομή 1 είναι ο μάρτυρας και στη διαδρομή 2 το πλασμίδιο pET-28a με το μεταλλαγμένο γονίδιο της hAng με μέγεθος 5.744 bp

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrev	
1. SDM_hAng_F4_T7	T A C T G C C G G C T T C C G T A A T G T T G T G G T T G C T T G T G A A A C G G T C T G C C A G T C C A T C T A G A T C C G T C T A
2. SDM_hAng_R4_T7	T A C T G C C G G C T T C C G T A A T G T T G T G G T T G C T T G T G A A A C G G T C T G C C A G T C C A T C T A G A T C C G T C T A
3. hANG	T A C T G C C G G C T T C C G T A A T G T T G T G G T T G C T T G T G A A A C G G T C T G C C A G T C C A T C T A G A T C C G T C T A

Εικόνα 8 Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης του μεταλλαγμένου γονιδίου σε σύγκριση με το αγρίου τύπου γονίδιο όπου φαίνεται η αντικατάσταση της αδενίνης με κυτοσίνη στη θέση 350. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα MegaX. Η αλληλουχία SDM_hAng_F4_T7 είναι αυτή που διαβάστηκε με τον εμπρόσθιο εκκινητή ενώ η SDM_hAng_R4_T7 είναι αυτή που διαβάστηκε με τον ανάστροφο εκκινητή

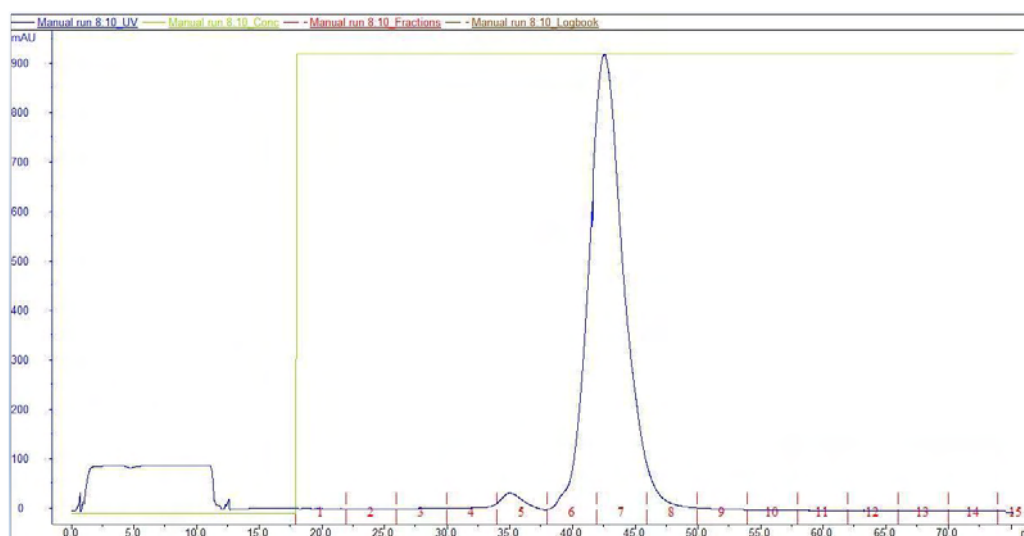
Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που φαίνονται στην Εικόνα 5 μεταφράστηκαν σε αμινοξικές αλληλουχίες με χρήση του Translate Tool του προγράμματος ExPASy. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν στοιχήθηκαν με το πρόγραμμα protein blast

Sequence ID: Query_139361 Length: 123 Number of Matches: 1					
Range 1: 1 to 123 Graphics					
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
257 bits(657)	1e-95	Compositional matrix adjust.	122/123(99%)	122/123(99%)	0/123(0%)
Query 1	QONSRYTHFLTQHYDAKPGGRDORYCESIMRRRGLTSPCKDINTFIHGKRSIKAICENK				60
Sbjct 1	QONSRYTHFLTQHYDAKPGGRDORYCESIMRRRGLTSPCKDINTFIHGKRSIKAICENK				60
Query 61	NGNPHRENLRISKSSFQVTTCKLHGGSPWPPCQYRATAGFRNVVACENGLPVHLQPSIF				120
Sbjct 61	NGNPHRENLRISKSSFQVTTCKLHGGSPWPPCQYRATAGFRNVVACENGLPVHLQPSIF				120
Query 121	RRP	123			
Sbjct 121	RRP	123			

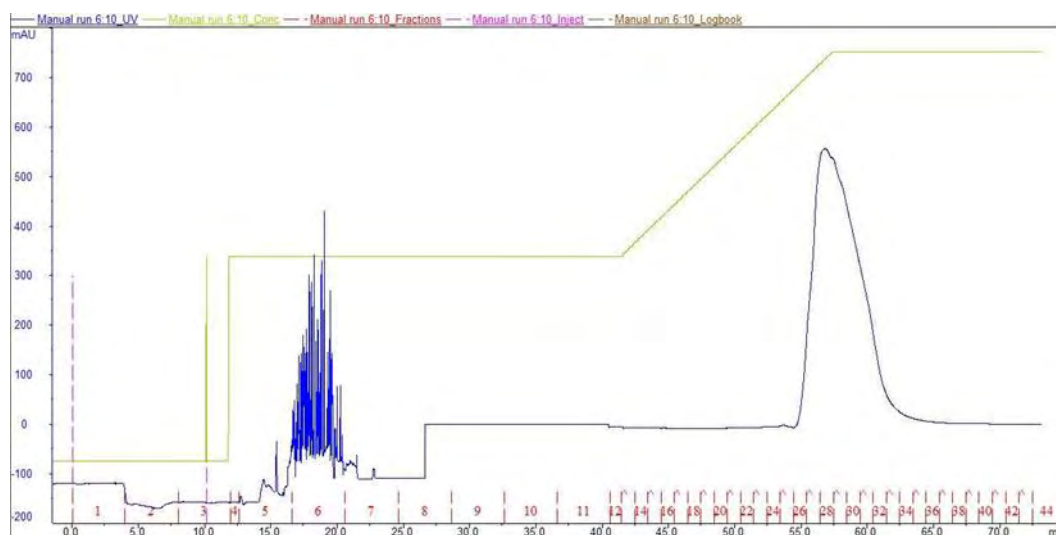
Q117P

Εικόνα 9 Αποτελέσματα Protein Blast με το πρόγραμμα blastp, όπου ακολουθία query είναι η αγγειογενίνη αγρίου τύπου ενώ η ακολουθία Sbjct είναι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη και φαίνεται πως έγινε η επιθυμητή αλλαγή.

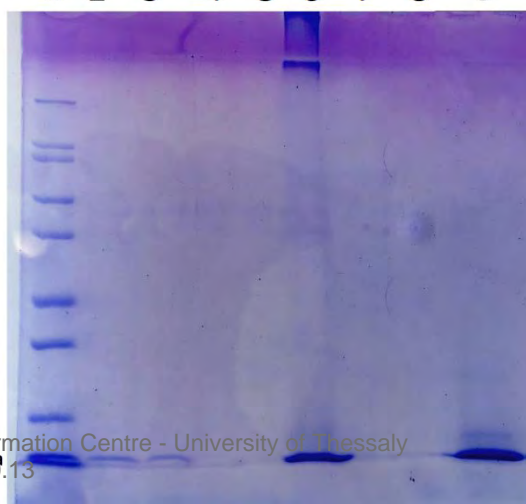
4.2 Αποτελέσματα χρωματογραφικού καθαρισμού της αγγειογενίνης Q117P



Εικόνα 10 Χρωματογράφημα της στήλης SPFF. Η πράσινη γραμμή αντιπροσωπεί την συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης. Η πρωτεΐνη εκλούστηκε σε 100% διάλυμα έκλουσης όπως φαίνεται και από την κορυφή απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm (μπλέ γραμμή.)



1 2 3 4 5 6 7 8 9



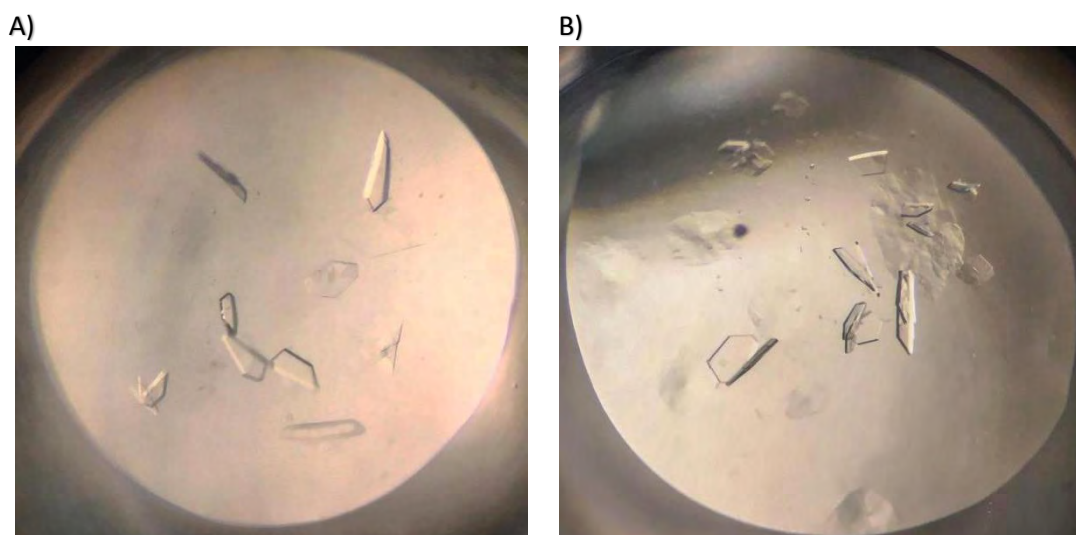
Εικόνα 11 Χρωματογράφημα της στήλης SPFF. Η πράσινη γραμμή αντιπροσωπεί την συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης. Η πρωτεΐνη εκλούστηκε σε 100% διάλυμα έκλουσης όπως φαίνεται και από την κορυφή απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm (μπλέ γραμμή.)

14 kDa

έγινε με διαβάθμιση συγκέντρωσης στο 48% του διαλύματος έκλουσης σε μήκος κύματος 280 nm

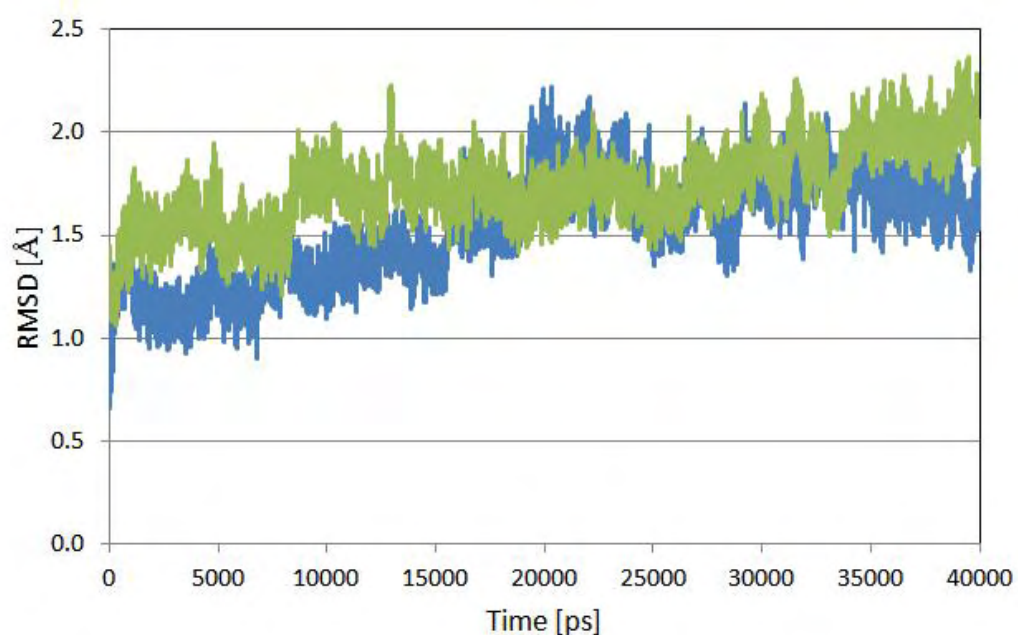
Εικόνα 12 Πηκτή 10 % SDS πολυακρυλαμίδιου, χρώση με Coomassie brilliant blue R-250. Στη διαδρομή 1 φαίνεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας με την τελευταία μπάντα να αντιστοιχεί στα 14 kDa. Στην διαδρομή 2 φαίνεται το πρωτεϊνικό δείγμα μετά την διαδικασία αναδίπλωσης. Στην διαδρομή 3 φαίνεται το πρωτεϊνικό διάλυμα που εισήχθη στη στήλη SPFF. Στις διαδρομές 4 και 5 φαίνονται τα πρωτεϊνικά κλάσματα από το flow through και το wash της στήλης SPFF αντίστοιχα, όπου υπάρχει ότι περνάει από την στήλη αλλά δεν προσδένεται. Στην διαδρομή 6 φαίνεται το πρωτεϊνικό διάλυμα που εισήχθη στην στήλη RPC18. Στις διαδρομές 7 και 8 φαίνονται τα πρωτεϊνικά κλάσματα από το flow through και το wash της RPC18 αντίστοιχα όπου υπάρχει ότι περνάει από την στήλη αλλά δεν προσδένεται. Στην διαδρομή 9 φαίνεται το πρωτεϊνικό κλάσμα μετά τη στήλη RPC 18.

4.3 Αποτελέσματα ανάπτυξης κρυστάλλων.

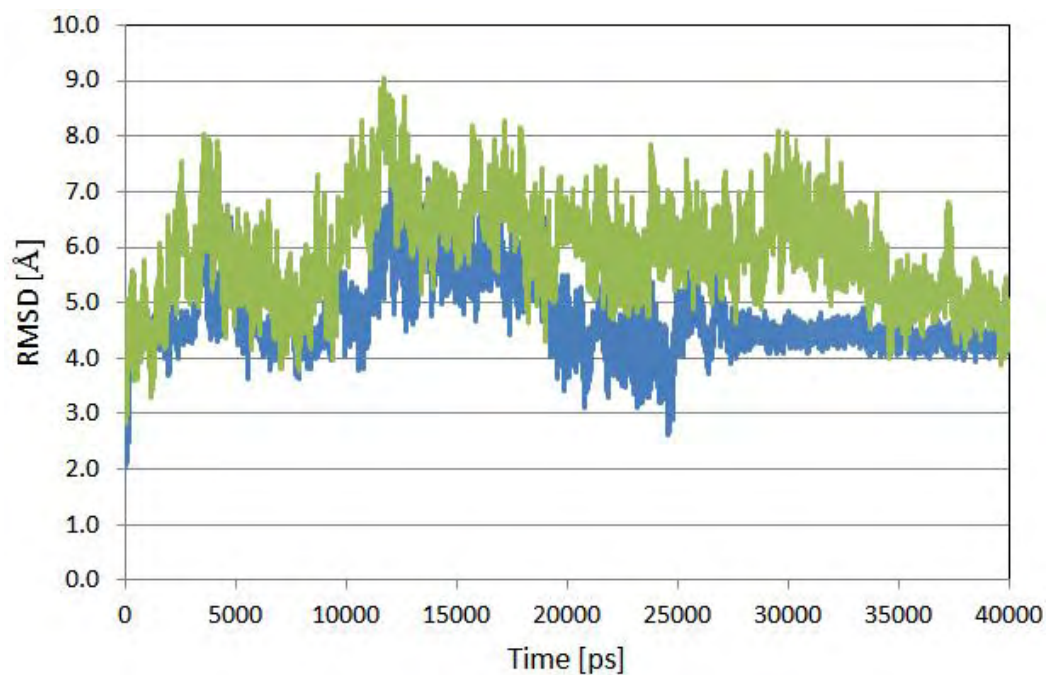


Εικόνα 13: Κρύσταλλοι της μεταλλαγμένης hAng-Q117P. Σύσταση του διαλύματος εξισορρόπησης (0.2% νατραζίδιο, 20% (v/v) PEG-300, 150mM μηλεϊνικό οξύ). Α) Συγκέντρωση της hAng στη σταγόνα 5 mg/mL. Β) Συγκέντρωση της hAng στη σταγόνα 7 mg/mL

4.4 Αποτελέσματα συγκριτικού σχεδιασμού



B) Διάγραμμα μεταβολής RMSD του CU της hAng και της hAng-Q117P

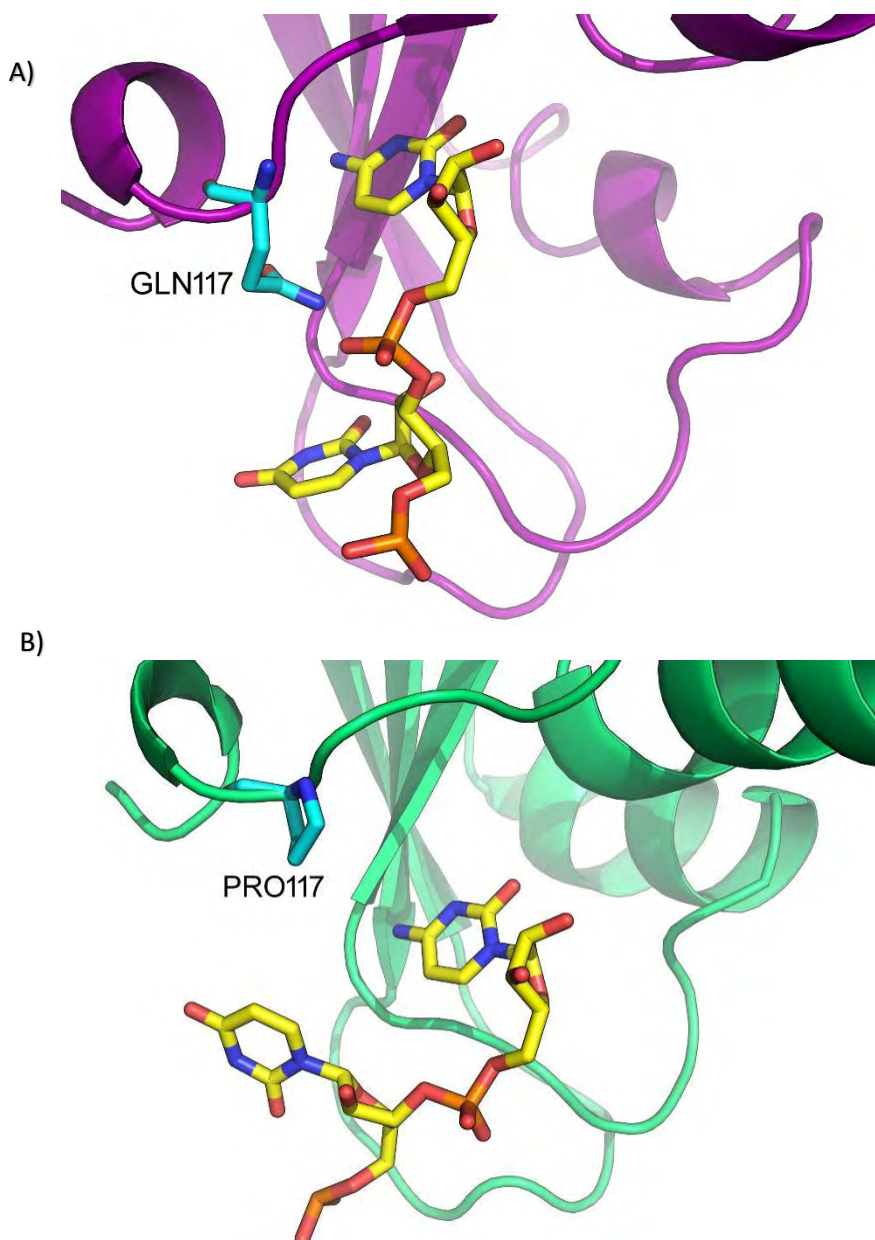


Εικόνα 16: Διάγραμμα μεταβολής του RMSD για τα σύμπλοκα της φυσιολογικής πρωτεΐνης και του προσδέτη (μπλε χρώμα) και της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης και του προσδέτη (πράσινο χρώμα) μετά το τέλος της δεύτερης προσομοίωσης μοριακής δυναμικής. Τα RMSD για τις πρωτεΐνες και για τους προσδέτες υπολογίστηκαν ξεχωριστά.. A) Διάγραμμα μεταβολής του RMSD για την φυσιολογική (μπλε χρώμα) και την μεταλλαγμένη (πράσινο χρώμα) hAng. B) Διάγραμμα μεταβολής RMSD για το δινουκλεοτίδιο που προσδένεται στην φυσιολογική και στην μεταλλαγμένη hAng-Q117P.



Το RMSD μεταλλαγμένης hAng-Q117P σε σχέση με την φυσιολογική είναι 2,158 Å

Το RMSD του δινουκλεοτιδίου που προσδένεται στην μεταλλαγμένη hAng-Q117P σε σχέση με αυτό που προσδένεται στην φυσιολογική hAng είναι 4,690 Å



Εικόνα 17. Τα αποτελέσματα της πρόσδεσης του δινουκλεοτιδίου CU, και συγκεκριμένα της κυτοσίνης, στο B_1 κέντρο στην φυσιολογική (A) και στην μεταλλαγμένη (B) hAng-Q117P. Ο προσδέτης στην μεταλλαγμένη δομή, υπέστη αλλαγές στην διαμόρφωση, έτσι ώστε να αξιοποιήσει καλύτερα τον επιπλέον χώρο που δημιουργήθηκε από την απουσία της πλευρικής αλυσίδας της Gln117

Μετά το πέρας των προσομοιώσεων της hAng και της hAng-Q117P μαζί με το δινουκλεοτίδιο, ακολούθησε ελαχιστοποίηση της ενέργειας των μέσων δομών από τα τελευταία 2 ns των προσομοιώσεων διάρκειας 40 ns. Από τις δομές που προέκυψαν υπολογίσθηκε η ενέργεια διαμόρφωσης και αλληλεπίδρασης με το δινουκλεοτίδιο. Διαπιστώθηκε ότι η ενέρ-

γεια του συμπλόκου της hAng-Q117P με το CU είναι κατά 105 kcal/mol μικρότερη από αυτήν της φυσιολογικής hAng. Πιο συγκεκριμένα :

Ενέργεια της δομής φυσιολογικής hAng-CU: 1.063,698 kcal/mol

Ενέργεια της δομής μεταλλαγμένης hAng-Q117P-CU: 958,948 kcal/mol

5.Συζήτηση

Η ανθρώπινη αγγειογενίνη είναι ένας από τους ισχυρότερους αγγειογενετικούς παράγοντες και φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο σε διεργασίες της φυσιολογικής ανάπτυξης αλλά και σε διαταραχές στις οποίες εμπλέκεται η διαδικασία της αγγειογένεσης. Πέρα από την αγγειογένεση η hAng συμμετέχει σε πολλές άλλες φυσιολογικές και μη διεργασίες του οργανισμού όπως η ογκογένεση, η έμφυτη ανοσία, η νευροπροστασία, η φλεγμονή και η αναγέννηση των ιστών που έχουν υποστεί βλάβη. Σε κυτταρικό επίπεδο, έχει βρεθεί πως η αγγειογενίνη εμπλέκεται στην ανάπτυξη και την απόπτωση, την διαφοροποίηση, στις διαδικασίες της μετάστασης και στην απόκριση στο στρες. Η hAng φαίνεται ακόμη να ενισχύει την μεταγραφή και την επεξεργασία του rRNA, την παραγωγή των tiRNAs και να ρυθμίζει την μεταγραφή συγκεκριμένων mRNA. Παρά την μεγάλη της ομοιότητα με τα άλλα μέλη της υπερικογένειας των παγκρεατικών ριβονουκλεασών, η ριβονουκλεολυτική δράση της hAng είναι σχεδόν ανυπολόγιστη. Κύριο αίτιο της μειωμένης ριβονουκλεολυτικής δράσης της hAng, είναι η παρεμπόδιση του κέντρου δέσμευσης των πυριμιδινών, από μια έλικα 3_{10} που συγκροτείται από τα αμινοξέα 117-121 αλλά και από την ίδια την πλευρική αλυσίδα της Gln117.

Η ριβονουκλεολυτική και η αγγειογενετική δράση της hAng είναι αλληλένδετες καθώς μελέτες μεταλλαξιγένεσης στα οποία υπάρχει απώλεια της ριβονουκλεολυτικής δραστηριότητας έδειξαν ότι επηρεάζεται αντιστοίχως και η αγγειογενετική δραστηριότητα της. Έτσι λοιπόν η κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στην χαμηλή ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της hAng παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς θα συμβάλλουν στην γενικότερη κατανόηση του τρόπου δράσης της αγγειογενίνης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε μια μεταλλαγμένη μορφή της hAng στην οποία η Gln117 αντικαταστάθηκε με προλίνη. Για τον σκοπό αυτό, το μετάλλαγμα δημιουργήθηκε με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, η μεταλλαγμένη hAng-Q117P απομονώθηκε από βακτηριακά στελέχη *E.coli* και η καθαρή πρωτεΐνη κρυσταλλώθηκε. Τέλος έγινε μελέτη των πιθανών αλλαγών που δημιούργησε η μετάλλαξη τόσο στην δομή, όσο και στην ικανότητα πρόσδεσης δινουκλεοτιδίων, με χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων μοντελισμού.

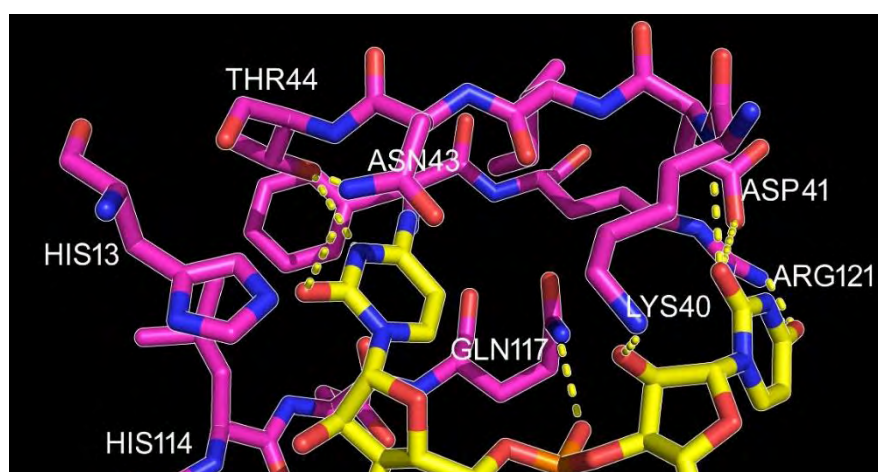
Από τον μοντελισμό προέκυψε πως παρότι υπήρξε μια ελαφρά μετατόπιση κάποιων τμημάτων της μεταλλαγμένης hAng-Q117P σε σχέση με την φυσιολογική, η συνολική διαμόρφωση παρέμεινε αμετάβλητη, κάτι που ήταν αναμενόμενο καθώς η μετάλλαξη ήταν σημειακή. Όσον αφορά την δομή της έλικας 3_{10} , η αντικατάσταση της γλουταμίνης 117 με προλίνη προκάλεσε μια "χαλάρωση" της έλικας, χωρίς όμως να προκαλέσει την καταστροφή της. Αυτό οφείλεται πιθανώς στις αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων που συγκροτούν την έλικα

3_{10} με τα γειτονικά κατάλοιπα. Είναι πιθανό πως στα πλαίσια της αυστηρής ρύθμισης της ριβονουκλεολυτικής δράσης της hAng, οι αλληλεπιδράσεις των καταλοίπων που συγκροτούν την έλικα 3_{10} , με τα γειτονικά τους κατάλοιπα να μην μπορούν να κλωνιστούν από μια μόνο σημειακή μετάλλαξη. Αυτό είναι σύμφωνο με προηγούμενες μελέτες όπου η Gln117 είχε αντικατασταθεί από Gly και η δομή της έλικας 3_{10} της μεταλλαγμένης μορφής hAng-Q117G δεν εμφάνισε σημαντικές δομικές διαφορές από την δομή της φυσιολογικής μορφής. (Leonidas *et al.*, 2002)

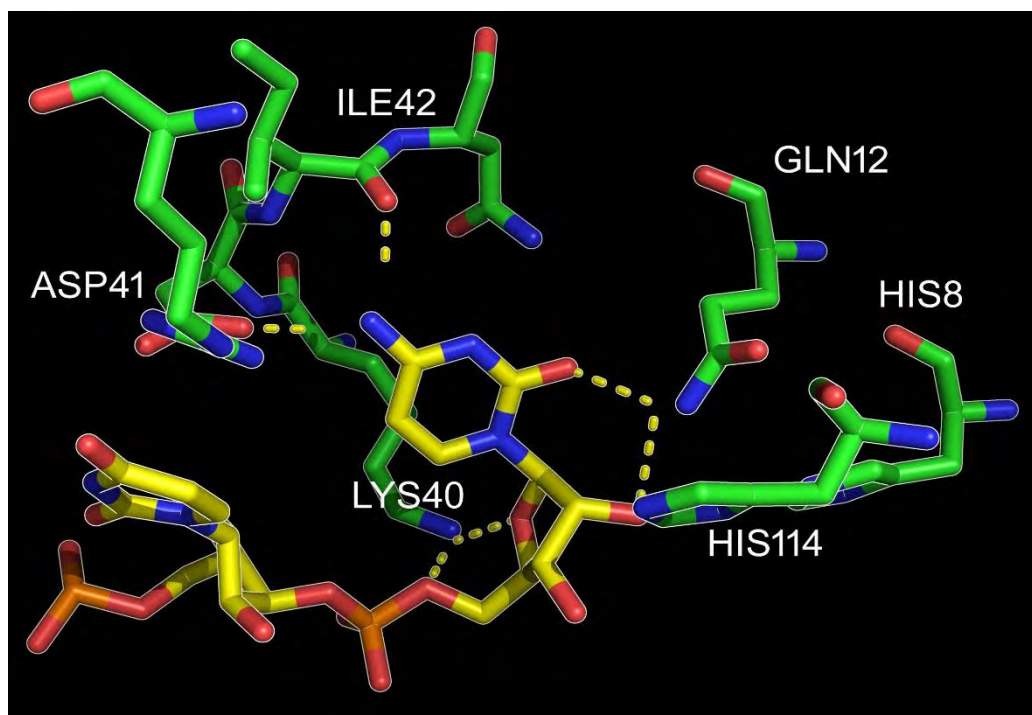
Τα αποτελέσματα πρόσδεσης του δινουκλεοτιδίου CU στο κέντρο πρόσδεσης των πυριμιδινών της hAng έδειξαν κάποιες διαφορές μεταξύ της φυσιολογικής και της μεταλλαγμένης hAng-Q117P. Πιο συγκεκριμένα, η ενέργεια σύνδεσης του CU ήταν μικρότερη κατά 105 kcal/mol στην hAng-Q117G, κάτι που σημαίνει ότι το δινουκλεοτίδιο προσδένεται καλύτερα. Επιπλέον με περεταίρω ανάλυση των δεσμών υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ των καταλοίπων της περιοχής πρόσδεσης του προσδέτη, και του CU καθώς και ανάλυση των καταλοίπων που βρίσκονται σε απόσταση ίση ή μικρότερη από 4 Å από το CU, εντοπίστηκαν διαφορές στις δύο δομές που φαίνονται στον πίνακα 5 καθώς και στις εικόνες 18 και 19.

Πίνακας 5. Δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ατόμων των πρωτεϊνών και των προσδετών,

CU της hANG	hANG	CU της hAng-Q117P	hAng-Q117P
O ₂ - UR	N ₂ - LYS40	O ₄ *- CYT	N ₂ - LYS40
N ₃ - UR	OD ₂ - ASP41	O ₅ P - CYT	N ₂ - LYS40
O ₂ - CYT	ND ₂ - ASN43	N ₄ - CYT	OD ₁ - ASP41
N ₃ - CYT	OG ₁ - THR44	N ₄ - CYT	O - ILE42
O ₁ P - CYT	NE ₂ - GLN117	O ₂ - CYT	NE ₂ - GLN12
O ₄ - UR	N ₂ - ARG121	O ₂ * - CYT	NE ₂ - GLN12



Εικόνα 18. Φυσιολογική hAng - CU Εστίαση στα κατάλοιπα που βρίσκονται σε ίση ή μικρότερη απόσταση από 4 Å από τον προσδέτη. Με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ατόμων του προσδέτη και της hAng.



Εικόνα 19: hAng-Q117P - CU Εστίαση στα κατάλοιπα που βρίσκονται σε ίση ή μικρότερη απόσταση από 4 Å από τον προσδέτη. Με κίτρινες διακεκομμένες γραμμές οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των ατόμων του προσδέτη και της hAng-Q117P.

Διαπιστώνεται ότι ο αριθμός των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ατόμων του προσδέτη και των ατόμων της θέσης πρόσδεσης είναι ο ίδιος. Ωστόσο, διαφέρουν τα ζεύγη δότη-δέκτη. Στο σύνολό τους τα αποτελέσματα αυτά, υποδεικνύουν πως μάλλον η κλειστή αυτή διαμόρφωση του καρβοξυτελικού άκρου της hAng είναι σημαντικός παράγοντας της ρύθμισης της ριβονουκλεολυτικής δραστηριότητας της hAng, και για τον λόγο αυτό είναι δύσκολο να διαταραχτεί. Φαίνεται πως για να αλλάξει η δομή του καρβοξυτελικού άκρου δεν φτάνει μια μόνο σημειακή μετάλλαξη, αλλά απαιτούνται πολλαπλές σημειακές μεταλλάξεις, ώστε να αποσταθεροποιηθούν οι δεσμοί που συγκροτούν την παρεμποδιστική έλικα 3_{10} . Τα μοντέλα των δύο συμπλόκων που προέκυψαν στο πλαίσιο αυτής της εργασίας μπορούν να αξιοποιηθούν για να σχεδιασθούν μελλοντικά πειράματα στοχευμένων μεταλλάξεων με σκοπό τον έλεγχο της σταθερότητας πρόσδεσης των πυριμιδινών.

6.Βιβλιογραφία

1. Boix, E., & Nogues, M. V. (2007). Mammalian antimicrobial proteins and peptides: overview on the RNase A superfamily members involved in innate host defence. *Mol Biosyst*, 3(5), 317-335. doi: 10.1039/b617527a
2. Bradshaw, W. J., Rehman, S., Pham, T. T., Thiyagarajan, N., Lee, R. L., Subramanian, V., & Acharya, K. R. (2017). Structural insights into human angiogenin variants implicated in Parkinson's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Scientific Reports*, 7, 41996. doi: 10.1038/srep41996
3. Chothia, C., & Lesk, A. M. (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J*, 5(4), 823-826.
4. Dubois, J. Y., Ursing, B. M., Kolkman, J. A., & Beintema, J. J. (2003). Molecular evolution of mammalian ribonucleases 1. *Mol Phylogenet Evol*, 27(3), 453-463.
5. Dyer, K. D., & Rosenberg, H. F. (2006). The RNase a superfamily: generation of diversity and innate host defense. *Mol Divers*, 10(4), 585-597. doi: 10.1007/s11030-006-9028-2
6. Emara, M. M., Ivanov, P., Hickman, T., Dawra, N., Tisdale, S., Kedersha, N., . . . Anderson, P. (2010). Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly. *J Biol Chem*, 285(14), 10959-10968. doi: 10.1074/jbc.M109.077560
7. Fett, J. W., Strydom, D. J., Lobb, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1985). Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry*, 24(20), 5480-5486.
8. Gao, X., & Xu, Z. (2008). Mechanisms of action of angiogenin. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 40(7), 619-624.
9. Hoang, T. T., & Raines, R. T. (2017). Molecular basis for the autonomous promotion of cell proliferation by angiogenin. *Nucleic Acids Research*, 45(2), 818-831. doi: 10.1093/nar/gkw1192
10. Holloway, D. E., Hares, M. C., Shapiro, R., Subramanian, V., & Acharya, K. R. (2001). High-level expression of three members of the murine angiogenin family in Escherichia coli and purification of the recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 22(2), 307-317. doi: 10.1006/prep.2001.1434S1046-5928(01)91434-2 [pii]
11. Humphrey, W., Dalke, A., Sculten, K. (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Mol. Graphics*, V. 14, 33-38, doi. 10.1016/0263-7855(96)00018-5
12. Ivanov, P., Emara, M. M., Villen, J., Gygi, S. P., & Anderson, P. (2011). Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Mol Cell*, 43(4), 613-623. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.022
13. Jain, A. N. (2006). Scoring functions for protein-ligand docking. *Curr Protein Pept Sci*, 7(5), 407-420.
14. King, T. V., & Vallee, B. L. (1991). Neovascularisation of the meniscus with angiogenin. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br*, 73(4), 587-590.
15. Kishimoto, K., Liu, S., Tsuji, T., Olson, K. A., & Hu, G. F. (2005). Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene*, 24(3), 445-456. doi: 10.1038/sj.onc.1208223

16. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov*, 3(11), 935-949. doi: 10.1038/nrd1549
17. Koczera, P., Martin, L., Marx, G., & Schuerholz, T. (2016). The Ribonuclease A Superfamily in Humans: Canonical RNases as the Buttress of Innate Immunity. *Int J Mol Sci*, 17(8). doi: 10.3390/ijms17081278
18. Lee, F. S., Shapiro, R., & Vallee, B. L. (1989). Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor. *Biochemistry*, 28(1), 225-230.
19. Lengauer, T., & Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Curr Opin Struct Biol*, 6(3), 402-406.
20. Leonidas, D. D., Shapiro, R., Subbarao, G. V., Russo, A., & Acharya, K. R. (2002). Crystallographic studies on the role of the C-terminal segment of human angiogenin in defining enzymatic potency. *Biochemistry*, 41(8), 2552-2562.
21. Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R.D., Kale, L., Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Comput. Chem.* V.26, 1871-1801, doi:10.1002/jcc.20289
22. Pizzo, E., Sarcinelli, C., Sheng, J., Fusco, S., Formiggini, F., Netti, P., . . . Hu, G. F. (2013). Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 regulates stress-induced subcellular localization of angiogenin to control growth and survival. *J Cell Sci*, 126(Pt 18), 4308-4319. doi: 10.1242/jcs.134551
23. Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1988). Human angiogenin, an organogenic protein. *Br J Cancer*, 57(6), 587-590.
24. Rosenberg, H. F. (2008). RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story. *J Leukoc Biol*, 83(5), 1079-1087. doi: 10.1189/jlb.1107725
25. Russo, N., Acharya, K. R., Vallee, B. L., & Shapiro, R. (1996). A combined kinetic and modeling study of the catalytic center subsites of human angiogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(2), 804-808.
26. Russo, N., Nobile, V., Di Donato, A., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1996). The C-terminal region of human angiogenin has a dual role in enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(8), 3243-3247.
27. Rutkoski, T. J., & Raines, R. T. (2008). Evasion of ribonuclease inhibitor as a determinant of ribonuclease cytotoxicity. *Curr Pharm Biotechnol*, 9(3), 185-189.
28. Sadagopan, S., Veetil, M. V., Chakraborty, S., Sharma-Walia, N., Paudel, N., Bottero, V., & Chandran, B. (2012). Angiogenin functionally interacts with p53 and regulates p53-mediated apoptosis and cell survival. *Oncogene*, 31(46), 4835-4847. doi: 10.1038/onc.2011.648
29. Shapiro, R., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1986). Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Biochemistry*, 25(12), 3527-3532.
30. Shapiro, R., & Vallee, B. L. (1992). Identification of functional arginines in human angiogenin by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 31(49), 12477-12485.
31. Sheng, J., & Xu, Z. (2016). Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 48(5), 399-410. doi: 10.1093/abbs/gmv131
32. Sobala, A., & Hutvagner, G. (2013). Small RNAs derived from the 5' end of tRNA can inhibit protein translation in human cells. *RNA Biol*, 10(4), 553-563. doi: 10.4161/rna.24285
33. Tello-Montoliu, A., Patel, J. V., & Lip, G. Y. (2006). Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(9), 1864-1874. doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01995.x

34. Trouillon, R., Kang, D. K., Park, H., Chang, S. I., & O'Hare, D. (2010). Angiogenin induces nitric oxide synthesis in endothelial cells through PI-3 and Akt kinases. *Biochemistry*, 49(15), 3282-3288. doi: 10.1021/bi902122w
35. van Es, M. A., Veldink, J. H., Schelhaas, H. J., Bloem, B. R., Sondaar, P., van Nuenen, B. F., . . . van den Berg, L. H. (2014). Serum angiogenin levels are elevated in ALS, but not Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 85(12), 1439-1440. doi: 10.1136/jnnp-2013-307168
36. Verselis, S. J., Olson, K. A., & Fett, J. W. (1999). Regulation of angiogenin expression in human HepG2 hepatoma cells by mediators of the acute-phase response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 259(1), 178-184.
37. Vlachakis, D., Bencurova, E., Papangelopoulos, N., & Kossida, S. (2014). Current state-of-the-art molecular dynamics methods and applications. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 94, 269-313. doi: 10.1016/B978-0-12-800168-4.00007-X
38. Voytas, D. (2001). Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 10, Unit 10 14. doi: 10.1002/0471142735.im1004s02
39. Weng, C., Dong, H., Chen, G., Zhai, Y., Bai, R., Hu, H., . . . Xu, Z. (2012). miR-409-3p inhibits HT1080 cell proliferation, vascularization and metastasis by targeting angiogenin. *Cancer Letters*, 323(2), 171-179. doi: S0304-3835(12)00258-3 [pii]
40. 10.1016/j.canlet.2012.04.010
41. Wu, D., Yu, W., Kishikawa, H., Folkerth, R. D., Iafrate, A. J., Shen, Y., . . . Hu, G. F. (2007). Angiogenin loss-of-function mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 62(6), 609-617. doi: 10.1002/ana.21221
42. Xu, Z. P., Tsuji, T., Riordan, J. F., & Hu, G. F. (2003). Identification and characterization of an angiogenin-binding DNA sequence that stimulates luciferase reporter gene expression. *Biochemistry*, 42(1), 121-128. doi: 10.1021/bi020465x
43. Yamasaki, S., Ivanov, P., Hu, G. F., & Anderson, P. (2009). Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J Cell Biol*, 185(1), 35-42. doi: 10.1083/jcb.200811106
44. Yu, Q., Wang, F., Hu, X., Xing, G., Deng, R., Guo, J., . . . Zhang, G. (2018). Comparison of two docking methods for peptide-protein interactions. *J Sci Food Agric*, 98(10), 3722-3727. doi: 10.1002/jsfa.8880
45. Shapiro, R., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1986). Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Biochemistry*, 25(12), 3527-3532.